

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»

*Посвящается 100-летию Витебского
государственного университета
имени П.М. Машерова*

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ

*Допущено Министерством образования
Республики Беларусь в качестве учебного пособия
для студентов и магистрантов высших учебных
заведений по биологическим специальностям*

Под редакцией
А.П. Солодкова и А.А. Чиркина

*Витебск
УО «ВГУ им. П.М. Машерова»
2010*

УДК 28.072я73
ББК 577.1(075.8)
С56

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова». Протокол № 5 от 23.06.2010 г.

Авторы: коллектив авторов под редакцией ректора УО «ВГУ им. П.М. Машерова», доктора медицинских наук, профессора **А.П. Солодкова** и заведующего кафедрой химии УО «ВГУ им. П.М. Машерова», доктора биологических наук, профессора **А.А. Чиркина**

Рецензенты:

заведующий кафедрой биохимии УО «БГМУ», доктор медицинских наук, профессор *А.Д. Таганович*;
заведующий лабораторией биотехнологии соединений нуклеиновой природы ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси *А.И. Зинченко*;
кафедра биохимии УО «БГМУ»

С56 **Современные проблемы биохимии** : учебное пособие / под ред. А.П. Солодкова и А.А. Чиркина. – Витебск : УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2010. – 384 с.
ISBN 978-985-517-272-8.

Учебное пособие по современным проблемам биохимии для студентов биологического факультета включает теоретические основы предмета, лабораторные работы, контрольные вопросы и современные источники литературы. Учебное пособие составлено из трудов специалистов-биохимиков Республики Беларусь, Института биологической и медицинской химии им. В.Н. Ореховича, ММА им. И.М. Сеченова (г. Москва) и призвано оказать помощь студентам биологических специальностей в изучении современных проблем биохимии в рамках специализации «Биохимия».

УДК 28.072я73
ББК 577.1(075.8)

ISBN 978-985-517-272-8

© УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2010

О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. Флуоресцентная спектроскопия в изучении структуры и функции белков (<i>Бокуть С.Б., Квасюк Е.И.</i>)	5
ГЛАВА 2. Окислительная трансформация тиамина и его производных гемопротеинами по пероксидазному механизму, катализируемая фенол-содержащими соединениями (<i>Степура И.И., Степура В.И.</i>)	28
ГЛАВА 3. Хемилюминесцентный метод в открытии антиоксидантной активности гемолимфы куколок дубового шелкопряда (<i>Коваленко Е.И., Чиркин А.А.</i>)	58
ГЛАВА 4. Биохимические аспекты метаболизма йода в организме (<i>Надольник Л.И.</i>)	81
ГЛАВА 5. Митохондрии и свободные радикалы (<i>Дремза И.К., Лапина Е.А., Чещевик В.Т., Заводник И.Б.</i>)	109
ГЛАВА 6. Биохимические механизмы апоптоза (<i>Данченко Е.О.</i>) ...	139
ГЛАВА 7. Репликативное старение клеток: молекулярные основы и методы терапевтического воздействия (<i>Жданов Д.Д.</i>) ...	165
ГЛАВА 8. Молекулярные шапероны HSP70 и их роль в современной иммунотерапии опухолей (<i>Черников В.А.</i>)	189
ГЛАВА 9. Опосредованные механизмы реализации эффектов ионизирующих излучений (<i>Петренев Д.Р., Наумов А.Д.</i>)..	214
ГЛАВА 10. Радиационно-индуцированные изменения характеристик андроген-специфичных белков и их вклад в нарушения гормональной регуляции (<i>Попов Е.Г., Наумов А.Д.</i>)	231
ГЛАВА 11. Современные проблемы биохимии и физиологии регуляции сосудистого тонуса (<i>Солодков А.П., Лазуко С.С.</i>)	255
ГЛАВА 12. Биохимия мелатонина (<i>Семак И.В.</i>)	310
ГЛАВА 13. Бактериальные L-аспарагиназы и методы анализа механизма их действия (<i>Абакумова О.Ю.</i>)	327
ГЛАВА 14. Физиолого-биохимические исследования иммобилизованных растительных клеток (<i>Юрин В.М., Дитченко Т.И., Молчан О.В., Ромашко С.Н., Шапчиц М.П.</i>)	336
ГЛАВА 15. Остеоиндуктивные свойства перламутра и его компонентов (<i>Ковтун Н.Е., Сеид-Гусейнов А.А., Повшенко А.Д.</i>) ...	358

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие «Современные проблемы биохимии» создано в соответствии с учебным планом и базовой программой подготовки студентов по специальности 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность); специализация 1-31 01 01-02 05 Биохимия. Этот предмет завершает подготовку специалистов в 10 семестре обучения студентов и предназначен для ознакомления с характером биохимических исследований, проводимых в ряде вузов Министерства образования и научно-исследовательских институтах Национальной академии наук Беларуси. Учебное пособие не претендует на исчерпывающую информацию о многогранных биохимических исследованиях белорусских ученых. Целью данного издания является демонстрация того, что биохимические методы исследования активно внедряются в фундаментальные и прикладные исследования не только в общепризнанных и авторитетных научных и педагогических центрах столицы нашего государства г. Минске, но и в университетах и НИИ Витебска, Гродно и Гомеля. Учитывая многолетние учебно-методические и научные связи биохимиков Республики Беларусь с учеными Института биологической и медицинской химии им. В.Н. Ореховича и ММА им. И.М. Сеченова (Москва), в учебное пособие включены также 4 статьи российских ученых.

Изучение современных проблем биохимии служит для достижения основной цели: подготовить выпускника-биохимика к профессиональной деятельности и сократить время его адаптации к решению научных, производственных и учебных биохимических задач. В соответствии с этим пособие включает материалы: по флуоресцентной спектроскопии как методе изучения взаимосвязи структуры и функции белков; окислительной трансформации тиамина и его производных гемопротеинами по пероксидазному механизму; о хемилюминесцентном методе оценки антиоксидантной активности биосубстратов; биохимических аспектах метаболизма йода в организме; о свободно-радикальных процессах в митохондриях; по расшифровке характера повреждающих хронических воздействий «относительно малых» (0,01–1,0 Грей) доз ионизирующих излучений; о радиационно-индуцированных нарушениях работы стероид-транспортных и рецепторных систем; о репликативном старении клеток; об активности и роли шаперонов; об эндотелиальных вазоактивных факторах и калиевых каналах; биохимических механизмах апоптоза; о молекулярной биотехнологии (L-аспарагиназы как уникальные по механизму действия противоопухолевые препараты); по физиолого-биохимическим исследованиям иммобилизованных растительных клеток; об остеоиндуктивных свойствах перламутра и его компонентов).

ГЛАВА 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

1. Флуоресцентные свойства 1-анилино-8-нафталинсульфоната (1,8-ANS) в растворах гемоглобинов человека A₁ и A_{1C} в оксисостоянии

При действии электромагнитного излучения на молекулы органических соединений (далее речь будет идти о поглощении энергии света) последние способны поглощать энергию этого излучения и переходить в возбужденное состояние. Энергия возбуждения обычно превращается в тепловую (кинетическую) энергию в результате столкновения таких молекул с молекулами растворителя. В ряде случаев поглощение света может приводить к химическим реакциям (например, реакция металепсии). Степень поглощения энергии зависит от структуры соединения и его молекулярного окружения. Молекула или ее часть, которая может быть возбуждена под действием видимого или ультрафиолетового света, называется *хромофором*. Регистрация поглощенной энергии, лежащая в основе адсорбционной спектроскопии (инфракрасной и ультрафиолетовой), позволяет получать различную информацию о строении органических соединений. В других случаях после возбуждения молекул органических соединений светом наблюдается возврат их в исходное состояние с одновременным испусканием света с большей длиной волны (т.е. с меньшей энергией). Это явление называется *люминесценцией* [от латинского *lumen* (род. падеж от *luminis* – свет), а суффикс *escent* обозначает слабое действие]. Люминесценция представляет собой избыточное над тепловым излучение, продолжающееся в течение времени, превышающем период световых колебаний. Люминесценцию называют иногда холодным свечением. Излучение люминесценции лежит в ближнем ультрафиолетовом, видимом и инфракрасном диапазонах спектра. К встречающимся в природе явлениям люминесценции относятся северное сияние, свечение некоторых насекомых, минералов и гниющего дерева. Явления люминесценции можно классифицировать по таким признакам, как тип возбуждения, механизм преобразования энергии, а также по длительности свечения. Так, исходя из типа возбуждения, различают фотолюминесценцию (возбуждение светом); радиолюминесценцию (возбуждение проникающей радиацией); электролюминесценцию (возбуждение электрическим полем); триболюминесценцию (возбуждение при механическом воздействии) и хемилюминесценцию (возникает при химических реакциях).

По длительности излучения люминесценцию подразделяют на флуоресценцию (время свечения 10^{-9} – 10^{-6} с) и фосфоресценцию (время свечения

от 10^{-4} до нескольких с). Необходимо заметить, что такое деление является условным.

По механизму элементарного процесса испускания света люминесценция подразделяется на резонансную, спонтанную, вынужденную и рекомбинационную.

Для понимания различий между флуоресценцией и фосфоресценцией необходимо представлять механизм возбуждения молекул соединений, содержащих хромофоры, а также пути возврата молекулы в исходное состояние. В соединениях, обладающих флуоресцентными свойствами, электроны находятся, в основном, в делокализованном состоянии, так как принадлежат сопряженным двойным связям жестких ароматических систем, типичным примером которых являются антрацен (1.1) и флуоресцеин (1.2) (рис. 1.1).

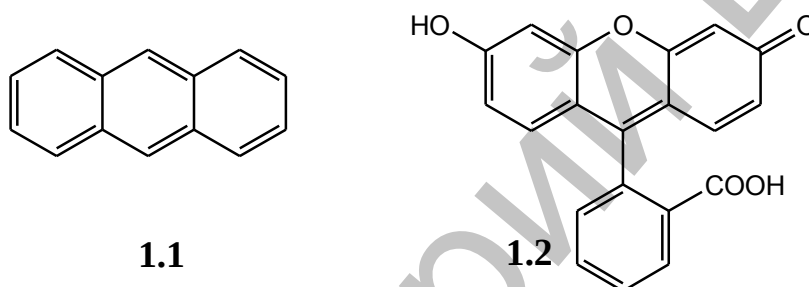


Рис. 1.1. Структурные формулы антрацена (1.1) и флуоресцеина (1.2).

Молекула в возбужденном состоянии, согласно законам квантовой механики, обладает набором дискретных энергетических состояний, называемых энергетическими уровнями молекулы. Главные энергетические уровни, которые определяются характером распределения электронов в пространстве, называются электронными энергетическими уровнями. На эти уровни накладываются так называемые колебательные и вращательные уровни, которые обозначают различные энергетические состояния молекулы, принимаемые ей в результате изменения длин связей и углов между ними. Необходимо помнить, что изменения, возникающие в молекуле вещества при поглощении энергии светового потока, происходят на электронном уровне. Наиболее чувствительными к таким изменениям являются *p*-электроны, входящие в состав хромофоров и образующие π -связи. Изменения энергетического состояния молекулы, происходящие при поглощении или испускания кванта энергии, называются переходом. Если говорить упрощенно, то *переходы между электронными энергетическими уровнями соответствуют энергии, необходимой для перемещения электрона с одной орбиты на другую.*

2. Диаграмма электронных энергетических состояний А. Яблонского

Перемещения электронов с орбиты на орбиту, наблюдаемые при поглощении энергии, происходят лишь тогда, когда величина поглощенной энергии (порция или квант энергии) соответствует разности энергии квантовых состояний электронов на этих орбитах. По этой причине набор дискретных энергетических состояний (энергетических электронных уровней) является квантованным и описывается законами квантовой механики. Схематическое изображение различных энергетических уровней и переходов, происходящих между основным и возбужденным состояниями многоатомной молекулы с синглетным основным состоянием, предложено А. Яблонским (рис. 1.2).

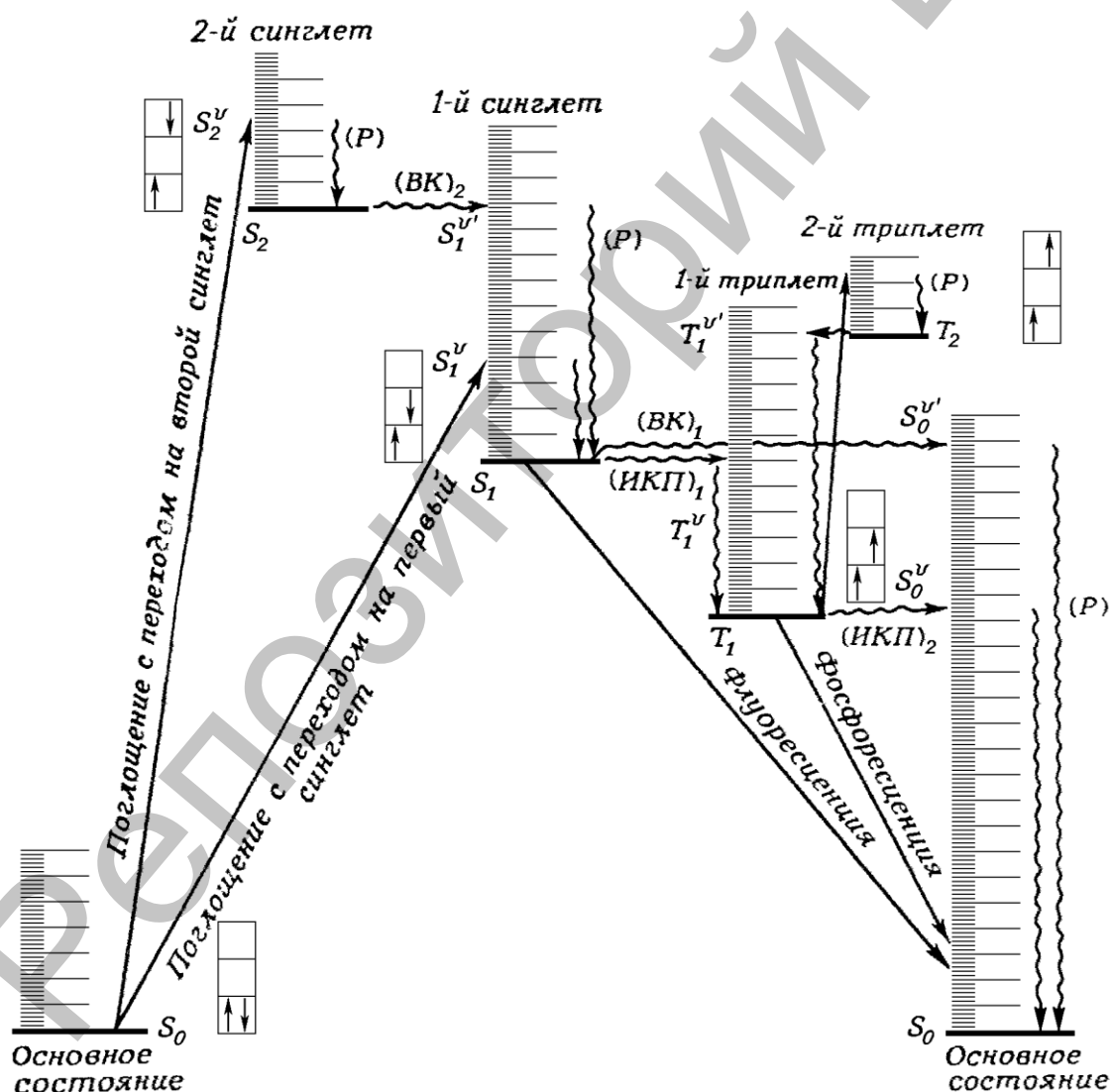


Рис. 1.2. Схематическое изображение переходов между энергетическими уровнями при возбуждении типичной многоатомной молекулы с синглетным основным состоянием.
[Гордон, А. Спутник химика / А. Гордон, Р. Форд. — М.: Мир, 1976. — 541 с.]

Частые горизонтальные линии на диаграмме изображают колебательные уровни в пределах одного электронного состояния.

Прямые стрелки показывают процессы поглощения или испускания света.

Волнистые стрелки показывают безизлучательные (тепловые процессы).

S_0 – энергетический уровень в основном невозбужденном синглетном состоянии;

S_0^v и $S_0^{v'}$ – колебательные и вращательные уровни основного невозбужденного состояния;

S_1 и S_2 – энергетические уровни в первом и втором возбужденных синглетных состояниях;

S_1^v , S_2^v и $S_1^{v'}$ – колебательные и вращательные уровни в возбужденных синглетных состояниях;

T_1 и T_2 – энергетические уровни в первом и втором возбужденных триплетных состояниях;

T_1^v и $T_1^{v'}$ – колебательные и вращательные уровни возбужденных триплетных состояний;

(P) – колебательно-вращательная релаксация с возбужденных колебательных уровней на нулевой колебательный уровень того же состояния;

$(BK)_1$ и $(BK)_2$ – внутренняя конверсия: безизлучательная (тепловая) релаксация молекулы на более низкий энергетический уровень той же мультиплетности;

$(ИКП)_1$ и $(ИКП)_2$ – интеркомбинационные переходы (конверсия или межсистемные переходы): безизлучательная инверсия спина (изменение мультиплетности возбужденного состояния типа $S \rightarrow T$ или $T \rightarrow S$).

Необходимо отметить, что переходы типа (BK) и $(ИКП)$ происходят между уровнями с различными электронными состояниями, но с одинаковыми энергиями.

Для того чтобы разбираться в процессах, описываемых диаграммой Яблонского, необходимо понимать физический смысл переходов между энергетическими уровнями, происходящих при поглощении молекулой органического соединения кванта света. Почти все устойчивые органические соединения имеют четное число электронов. В основном, невозбужденном, состоянии электроны попарно занимают низшие энергетические орбиты так, что одинаковое число электронов имеет положительное и отрицательное значения спинов, т.е. электронные спины спарены. Эти электронные орбиты могут быть орбитами химических связей, молекулярными орбитами, несвязывающими орбитами гетероатомов и т.д. Молекула со спаренными электронными спинами не обладает суммарным магнитным момен-

том, и ее состояние называется синглетным S_0 . При поглощении молекулой кванта видимого или ультрафиолетового света какой-то электрон (обычно электрон π -связи) возбуждается до одной из незанятых молекулярных орбит S_1 или S_2 . Этот процесс, приводящий к появлению двух орбит, содержащих только по одному электрону, называется распариванием, и в этом случае электронные спины, следуя правилу отбора, не изменяются. Правило отбора может не соблюдаться в случае молекул, содержащих атомы тяжелых металлов, или молекул, подвергнутых влиянию сильных локальных полей, создаваемых парамагнитными частицами. Переход молекулы из невозбужденного состояния S_0 в возбужденное состояние S_1 или S_2 зависит от длины волны поглощенного света. С уменьшением длины волны поглощенного света (от красного до синего света) увеличивается вероятность перехода молекулы на энергетически более высокий возбужденный синглетный уровень S_2 . Возбужденные электронные состояния молекул быстро дезактивируются по различным механизмам. Один из возможных путей дезактивации включает цепочку последовательных переходов: колебательно-вращательная релаксация (P) в пределах одного уровня как основного, так и возбужденного состояний; безизлучательная (тепловая) релаксация молекулы, называемая внутренней конверсией (BK_1 или BK_2), с переходом с более высокого на более низкое возбужденное состояние $S_2 \rightarrow S_1$ без изменения спиновой мультиплетности; безизлучательные интеркомбинационные переходы ($ИКП_1$ и $ИКП_2$) с изменением спиновой мультиплетности $S_1 \rightarrow T_1$ и $T_1 \rightarrow S_0^v$. В результате этих превращений переход молекулы из возбужденного в исходное состояние происходит с переходом энергии возбуждения в энергию поступательного движения молекул, энергию вращения и колебаний и перераспределения между всеми молекулами системы, т.е. безизлучательно.

Другой путь дезактивации синглетных возбужденных состояний S_1 и S_2 состоит в испускании молекулой кванта света с переходом ее в основное синглетное состояние S_0 и возвращением возбужденного электрона на исходную электронную орбиту. Этот процесс и является, собственно, флуоресценцией. При этом необходимо помнить, что такой переход может происходить только из первого возбужденного состояния S_1 (исключением является флуоресценция азулена, где реализуется переход $S_2 \rightarrow S_0$) в основное состояние S_0 . Поэтому при возбуждении молекулы до более высокого возбужденного состояния S_2 она должна сначала перейти в состояние S_1 путем колебательно-вращательных релаксаций (P) и внутренней конверсии (BK_2). Это и объясняет тот факт, что спектр флуоресценции не зависит от длины волны поглощаемого света.

Помимо прямого перехода молекулы из первого синглетного возбужденного состояния S_1 в исходное синглетное состояние S_0 без изменения мультиплетности реализуется и другой механизм дезактивации с испусканием кванта света. Он заключается в том, что из состояния S_1 в результате интеркомбинационного перехода ($ИКП_1$), протекающего с обращением спина одного из электронов, молекула переходит в более устойчивое, чем S_1 , состояние, обладающее магнитным моментом, обусловленное наличием пары электронов с параллельными спинами. Такое новое состояние из-за возможного различного направления магнитного момента (практически три разных направления: по направлению внешнего магнитного поля, перпендикулярно полю и против направления магнитного поля) называется возбужденным триплетным состоянием T_1 . Дальнейшая дезактивация молекулы из состояния T_1 может реализоваться путем безизлучательных переходов ($ИКП_2$) и (P) в исходное состояние S_0 , как описывалось ранее, или прямым переходом $T_1 \rightarrow S_0$, происходящим с изменением мультиплетности (возврат в синглетное состояние), исчезновением магнитного момента и испусканием света. Этот последний переход, протекающий с испусканием света, называется фосфоресценцией. Поскольку переход $T_1 \rightarrow S_0$ требует изменения мультиплетности, то вероятность его реализации довольно мала (запрещенный переход), что и объясняет большое время жизни триплетного состояния, дезактивация которого происходит, в основном, путем безизлучательных переходов.

Хотя возбужденное синглетное и соответствующее ему триплетное состояние имеют одинаковое распределение электронов, триплетное состояние всегда более устойчиво. Эта устойчивость объясняется тем, что в возбужденном триплетном состоянии два электрона с параллельными спинами расположены дальше друг от друга, чем электроны с противоположными спинами в синглетном состоянии. Кстати, из-за малого времени, в котором молекула находится в возбужденном синглетном состоянии, для нее возможны лишь мономолекулярные процессы с разрывом связи (реакции диссоциации) или отсутствие таковых. В то же время в более устойчивом возбужденном триплетном состоянии молекулы могут вступать в обычные бимолекулярные реакции. Таким образом, фосфоресценция отличается от флуоресценции большим временем затухания и тем, что фосфоресцирующая молекула находится в триплетном состоянии.

3. Спектры испускания

Так как при флуоресценции и фосфоресценции часть поглощенной молекулой энергии теряется на безизлучательные переходы, то испускаемый свет имеет большую длину волны. Это смещение максимума испускаемого света по отношению к максимуму поглощения называется сдвигом Стокса (Г. Стокс впервые наблюдал это явление в 1852 году). Величина сдвига Стокса при фосфоресценции больше, чем при флуоресценции из-за большого количества безизлучательных переходов, приводящих к большим потерям энергии.

Эффективность флуоресценции характеризуется величиной квантового выхода флуоресценции. Квантовый выход представляет собой отношение числа излучаемых фотонов к общему числу поглощенных фотонов.

Максимальное значение квантового выхода соответствует единице, однако из-за стоксовых потерь (безизлучательные переходы) квантовый выход флуоресценции всегда меньше единицы. Многие внешние факторы окружения молекулы, такие, как природа растворителя и растворенных в ней соединений, их концентрация, температура и значения рН, часто приводят к уменьшению квантового выхода флуоресценции. Такое снижение квантового

выхода называется тушением флуоресценции, а непосредственные участники тушения флуоресценции называются тушителями флуоресценции.

Еще одним важным параметром флуоресценции является время ее затухания, которое представляет собой средний промежуток времени (10^{-9} – 10^{-6} с), в течение которого молекула остается в возбужденном состоянии. Данные о временах жизни флуоресценции могут дать детальную информацию о взаимодействии флуорофора с его окружением, в частности о частоте столкновений флуоресцирующих молекул с молекулами тушителей флуоресценции.

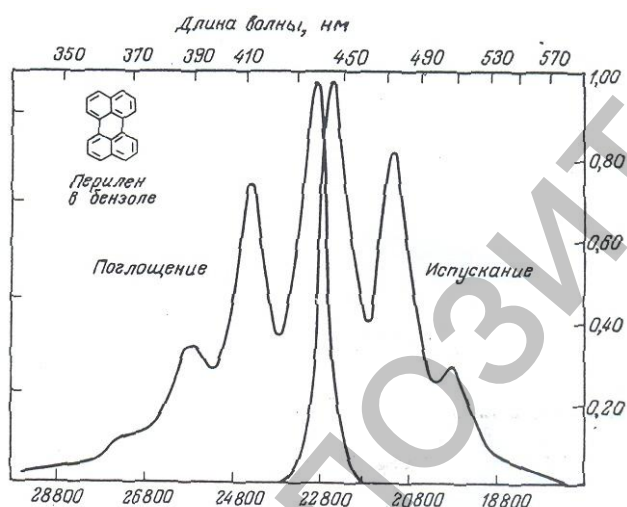


Рис. 1.3. Спектры поглощения и испускания перилена [1, 2].

тоте столкновений флуоресцирующих молекул с молекулами тушителей флуоресценции.

Спектр испускания флуоресценции представляет собой графическое изображение зависимости интенсивности флуоресценции от длины волны (в нм) или от волновых чисел (в см^{-1}), как показано на рис. 1.3 и 1.4 (спектры перилена и хинина соответственно).

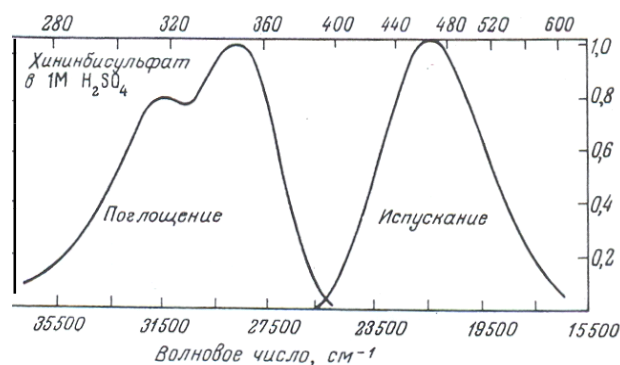


Рис. 1.4. Спектры поглощения и испускания хинина [1, 2].

Спектры флуоресценции зависят как от химической структуры флуорофора, так и от растворителя. Спектры некоторых соединений имеют четкую структуру, обусловленную отдельными колебательными подуровнями энергии основного состояния, как это видно на спектрах перилена (рис. 1.3).

Обычно спектр флуоресценции представляет собой зеркальное отражение спектра поглощения, точнее того поглощения, которое соответствует переходам $S_0 \rightarrow S_1$, что видно на спектрах поглощения и испускания перилена (рис. 1.3). Симметричная форма этих спектров определяется тем, что и поглощение, и испускание света обусловлены одними и теми же переходами и сходством колебательных энергетических подуровней в состояниях S_0 и S_1 . Такая симметрия в спектрах поглощения и флуоресценции наблюдается в том случае, когда все электронные переходы происходят без изменения межъядерных расстояний (принцип Франка–Кондона), в противном случае симметрия в спектрах поглощения и флуоресценции отсутствует.

4. Природные флуорофоры

К природным соединениям, обладающим флуоресцентными свойствами, – флуорофорам – относятся аминокислоты триптофан, тирозин и фенилаланин, а также пептиды, белки и другие биополимеры, содержащие эти аминокислоты. Белки, у которых максимум поглощения света находится в области 280 нм, обладают спектрами флуоресценции с максимумом излучения в области 320–350 нм. Времена затухания флуоресценции триптофановых фрагментов лежат в диапазоне 1–6 наносекунд. Флуоресценция, обусловленная остатками фенилаланина, не играет значительной роли из-за малого квантового выхода флуоресценции, а флуоресценция тирозина полностью потушена, если он находится в ионизированной форме.

Нуклеиновые кислоты и их компоненты обычно не флуоресцируют или флуоресцируют только при низких температурах. Однако некоторые минорные компоненты, содержащие, например, 7-N-метилгуанин (1.3), или

так называемое Y-основание (Wybutine) (1.4) обладают флуоресценцией и при положительных температурах (рис. 1.5).

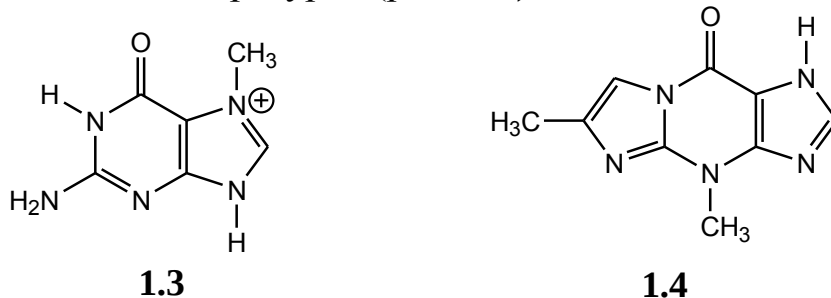


Рис. 1.5. Структурные формулы флуоресцирующих минорных оснований нуклеиновых кислот.

Среди производных нуклеозидов и нуклеотидов сильной флуоресценцией обладают рибофлавин (витамин В₂) (1.5), его монофосфат (1.6) и флавинадениндинуклеотид (1.7), которые поглощают видимый свет в области 450 нм, а испускают в области 515 нм с временами жизни 4,7 наносекунды для флавиномононуклеотида (1.6) и 2,3 нс для флавинадениндинуклеотида (1.7) (рис. 1.6).

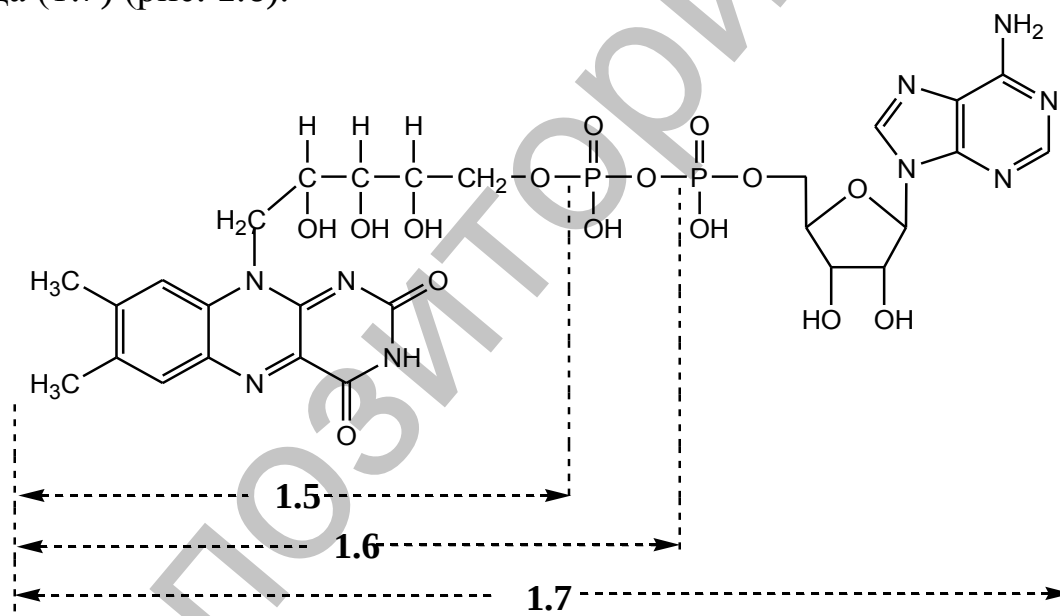


Рис. 1.6. Структурные формулы рибофлавина (1.5), флавиномононуклеотида (1.6) и флавинадениндинуклеотида (1.7).

К сильным флуорофорам относится также и такой кофактор, как восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (1.8) (рис. 1.7). Максимумы поглощения и испускания в его спектрах расположены при 340 и 450 нм соответственно, а время затухания флуоресценции составляет 0,4 нс.

Интересно отметить, что присутствие в молекуле соединения аденинового фрагмента приводит к тушению флуоресценции.

Основной целью изучения собственной флуоресценции белков является получение информации о конформации белковых молекул. Такая возможность обусловлена тем, что флуоресценция триптофана и тирозина в сильной степени зависит от внешнего окружения этих фрагментов, как упоминалось ранее.

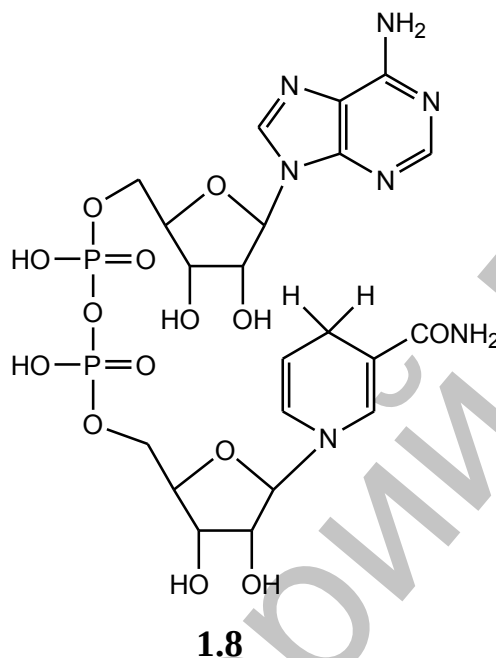


Рис. 1.7. Структурная формула восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (1.8).

Для трактовки спектров собственной флуоресценции белков существует ряд эмпирических правил, которые были выработаны при изучении флуоресценции модельных соединений и используются на практике.

5. Искусственные флуорофоры

Часто естественная флуоресценция биомолекул не позволяет получать информацию об их конформации, структуре и свойствах активных центров, а также о локализации флуоресцирующих фрагментов. В таких случаях в нативную молекулу биополимера вводятся синтетические флуорофоры, обладающие лучшими спектральными свойствами, по сравнению с присутствующими в молекуле естественными флуорофорами. Для таких синтетических флуорофоров используется термин «флуоресцентная метка», или «флуоресцентный зонд». Однако использование зондов ограничено рядом требований к флуоресцирующему хромофору. К таким требованиям относятся прочность связывания зонда со строго определенными участками макромолекул, чувствительность его флуоресценции к условиям

окружения, а сам зонд не должен оказывать существенного влияния на свойства исследуемой биомолекулы.

Число известных в настоящее время искусственных флуорофоров довольно велико. К наиболее часто используемым искусственным флуорофорам можно отнести такие соединения, как флуоресцеин (1.2) (рис. 1.1) и его производные, а также дансилхлорид (1.9), 1-анилино-8-нафталинсульфоновая кислота (1.10), 2-*n*-толуидинилнафталин-6-сульфоновая кислота (1.11) (рис. 1.8) и другие.

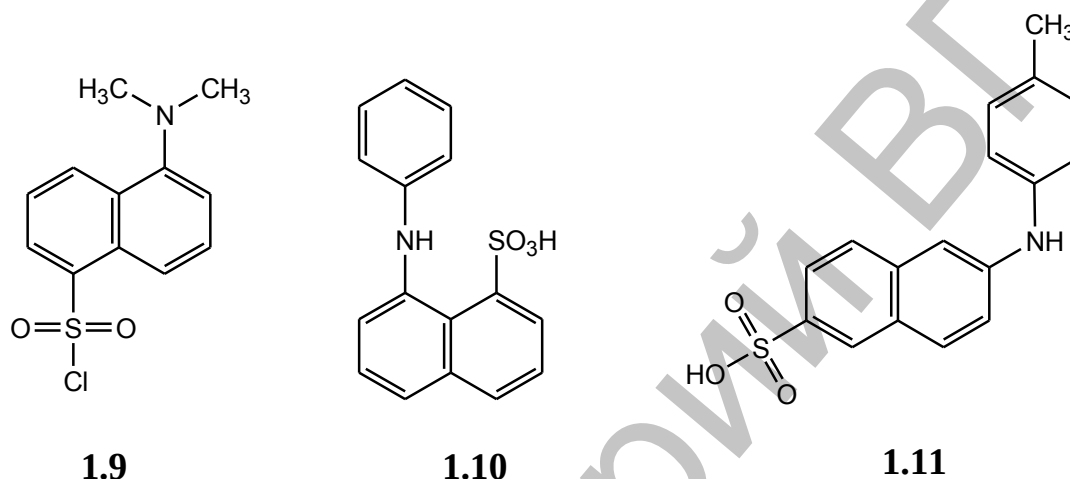


Рис. 1.8. Структурные формулы некоторых искусственных флуорофоров.

Указанные выше зонды почти не флуоресцируют в воде, но обладают интенсивной флуоресценцией в неполярных растворителях или при связывании их с макромолекулами. Тот факт, что квантовый выход флуоресценции зондов существенно возрастает при уменьшении полярности окружения этих молекул, нашел широкое применение для обнаружения с их помощью неполярных участков в молекулах белков.

Для флуоресцентного маркирования различных классов биомолекул используются зонды со своими специфическими свойствами. Так, для получения флуоресцентно меченых липидов и клеточных мембран используются такие гидрофобные соединения, как производные нафталина (рис. 1.8), 9-винилантрацен (1.12), перилен (1.13) и 1,6-дифенилгексатриен (1.14) (рис. 1.9) и их производные.

Данные зонды нерастворимы в воде и встраиваются в гидрофобные участки мембран. Особенностью таких ароматических соединений является низкая чувствительность их флуоресценции к полярности растворителя.

Для флуоресцентного маркирования нуклеиновых кислот были синтезированы такие производные аденозина, как этеноаденозинмонофосфат

(1.15), лин-бензоаденозинмонофосфат (1.16), профлавин (1.17), а также ряд их производных (рис. 1.10).

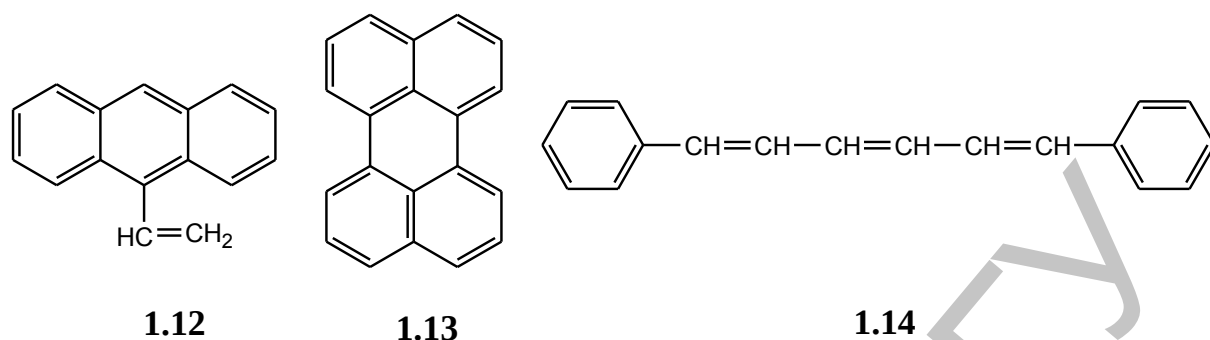


Рис. 1.9. Структурные формулы гидрофобных флуоресцентных зондов.

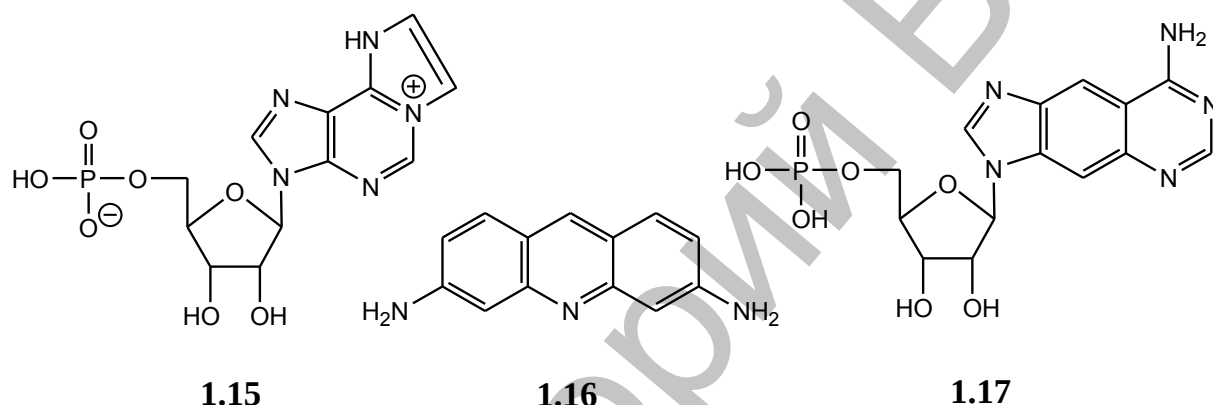


Рис. 1.10. Структуры некоторых флуоресцентных зондов для маркирования нуклеиновых кислот.

Флуоресцентные нуклеотидные аналоги сами обладают биологической активностью в ряде реакций, катализируемых ферментами, а также способны образовывать водородные связи с природными компонентами нуклеиновых кислот.

Флуоресцентные методы исследований находят широкое применение в биологии и медицине, так как дают ценные сведения об электронной структуре молекул в возбужденном состоянии. Благодаря высокой чувствительности они также используются в химическом и биохимическом анализе, например, в флуоресцентном иммуноферментном анализе. Флуоресценция позволяет получать сведения о конформации макромолекул и свойствах активных центров ферментов. Изучение флуоресценции растворов белков в различных условиях используется при изучении процессов денатурации белка, локализации флуоресцентных аминокислот в молекулах белка, для обнаружения таких фрагментов, как остатки жирных кислот в молекулах сложных белков, для определения концентрации ДНК и числа цепей в полинуклеотидах и т.д.

6. Анализ распределения времен затухания флуоресценции 1-анилино-нафталин-8-сульфоната в растворах нативных оксигемоглобинов человека HbA₁ и HbA_{1c}

Метод флуоресцентной спектроскопии нашел широкое применение в изучении свойств таких сложных белков, как, например, миоглобин и гемоглобин. Аминонафталиновые флуоресцентные зонды, в том числе 1-анилинонафталин-8-сульфонат (1,8-ANS), являются самыми известными и наиболее часто используемыми флуоресцентными зондами, параметры флуоресценции которых в значительной степени определяются структурно-динамическими свойствами белковых молекул.

Первые исследования с применением 1,8-ANS показали, что взаимодействие этого зонда с апомиоглобином и апогемоглобином приводит к заметному увеличению интенсивности его флуоресценции. Указанные изменения сопровождаются сдвигом максимума спектра флуоресценции зонда в коротковолновую область – от 515 нм для его водных растворов до 470–486 нм для комплексов 1,8-ANS с апоформами миоглобина и гемоглобина. При этом участками специфического связывания 1,8-ANS являются гемовые карманы этих белков. Время жизни флуоресценции 1,8-ANS в таких комплексах изменяется в пределах от 15,3 до 18,2 наносекунды.

Несмотря на значительные успехи в использовании 1,8-ANS и других зондов для исследования свойств апоформ миоглобина и гемоглобина, наиболее интересным с позиции функциональной значимости представляется изучение с помощью флуоресцентных зондов структурно-динамических свойств нативных молекул гемоглобина. И это несмотря на то, что в отношении 1,8-ANS утвердилась единая точка зрения – данный зонд не может быть использован для изучения свойств оксигемоглобина и нативного миоглобина как из-за возможного сильного тушения его флуоресценции гемовыми группами, так и из-за отсутствия отличных от гемового кармана сайтов связывания.

Анализ мгновенных спектров флуоресценции 1,8-ANS в растворе оксигемоглобина (рис. 1.11) позволил сделать следующее заключение: положение спектра, зарегистрированного в максимуме импульса возбуждения ($t = 0$ нс), свидетельствует о том, что он относится к флуоресценции 1,8-ANS в буфере. При увеличении времени задержки регистрации ($t = 4$ и 6 нс) флуоресценции происходит существенное смещение мгновенных спектров в коротковолновую область с заметным одновременным увеличением интенсивности его флуоресценции (на рис. 1.11 приведены *нормализованные* спектры). Поскольку в отсутствие гемоглобина при используе-

мых концентрациях 1,8-ANS флуоресценция в области 470–486 нм не регистрируется, наблюдаемый эффект однозначно относится к связыванию зонда с оксигемоглобином [3].

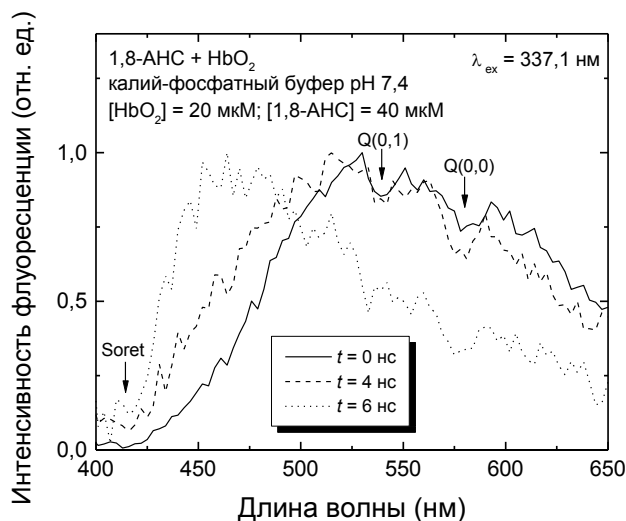


Рис. 1.11. Мгновенные спектры испускания флуоресценции 1,8-ANS в растворе оксигемоглобина в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 7,4, зарегистрированные в моменты времени $t = 0$ нс (—), 4 (---) и 6 нс ($\cdots$). $[\text{HbA}_1\text{O}_2] = 20$ мкМ, $[1,8\text{-ANS}] = 40$ мкМ. Длина волны возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 337,1$ нм; $T = 20$ °C. Стрелками Soret, Q (0,1), и Q (0,0) отмечены полосы Соре и полосы поглощения оксигемоглобина в видимой области.

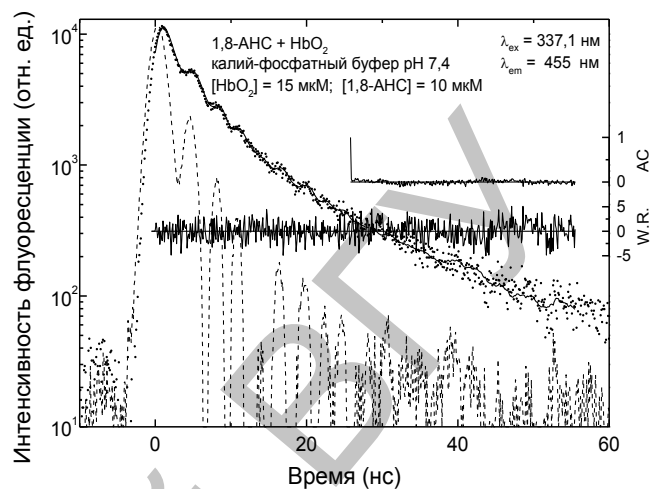


Рис. 1.12. Экспериментально измеренная кинетика затухания флуоресценции 1,8-ANS в растворе оксигемоглобина человека в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 7,4 ($\cdots$), аппаратная функция спектрофлуориметра (---) и кинетика затухания флуоресценции, восстановленная в процессе анализа распределения времен затухания (—). На горизонтальных вставках показаны графики взвешенных остаточных отклонений (W.R.) и их автокорреляционной функции (AC). Длины волн возбуждения и регистрации $\lambda_{\text{ex}} = 337,1$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 455$ нм. $[\text{HbA}_1\text{O}_2] = 15$ мкМ; $[1,8\text{-ANS}] = 10$ мкМ; $T = 20$ °C.

Флуоресцентная спектроскопия с субнаносекундным временным разрешением является одним из наиболее информативных методов исследования взаимодействия белков с молекулами флуорофоров. Кинетики затухания флуоресценции 1,8-ANS в растворе оксигемоглобина на различных длинах волн в диапазоне 455–600 нм носят не моноэкспоненциальный характер (кинетика затухания флуоресценции, зарегистрированная на длине волны 455 нм, представлена на рис. 1.12).

Анализ кривых затухания флуоресценции позволяет обнаружить наличие трех компонент в затухании флуоресценции с существенно различающимися временами затухания (рис. 1.12, табл. 1.1) [3].

Таблица 1.1 – Параметры затухания флуоресценции 1,8-ANS в растворах оксигемоглобинов человека HbA₁ и HbA_{1C} в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 7,4 в отсутствие и в присутствии инозитолгексафосфата [ИНР] для длины волны испускания 485 нм. Длина волны возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 337,1$ нм. [HbA₁O₂] = 16 мкМ; [HbA_{1C}O₂] = 16 мкМ; [1,8-ANS] = 10 мкМ; [ИНР] = 40 мкМ; температура 20 °С

Система	Метод анализа кинетических данных ^{а)}	Параметры затухания флуоресценции					
		f_1	τ_1 , нс	f_2	τ_2 , нс	f_3	τ_3 , нс
HbA ₁ O ₂ , 1,8-ANS	3-exp	0,125	0,85	0,373	3,78	0,502	11,74
HbA ₁ O ₂ , 1,8-ANS, ИНР	3-exp	0,365	0,87	0,348	4,55	0,286	12,28
HbA _{1C} O ₂ , 1,8-ANS	3-exp	0,372	0,32	0,255	3,52	0,372	11,79
HbA _{1C} O ₂ , 1,8-ANS, ИНР	3-exp	0,471	0,51	0,247	3,93	0,282	11,37

Примечание: ^{а)} трехэкспоненциальная (3-exp) деконволюция.

Для удобства представления (рис. 1.13), распределения времен затухания построены в координатах «времена жизни (τ_i) – стационарные интенсивности ($f_i \tau_i$)».

Кинетические параметры флуоресценции 1,8-ANS в составе комплекса с оксигемоглобином указывают на то, что молекула оксигемоглобина обладает отличными от гемовых карманов центрами связывания зонда. Образование комплекса Hb–1,8-ANS подтверждается наличием двух медленных компонент в кинетике затухания флуоресценции (рис. 1.13, табл. 1.1), а также коротковолновым сдвигом максимума мгновенных спектров люминесценции зонда (рис. 1.11).

Совокупность представленных данных позволяет классифицировать наблюдаемые три процесса затухания флуоресценции зонда следующим образом. Короткоживущая компонента флуоресценции 1,8-ANS с продолжительностью порядка нескольких сотен пикосекунд (пс) испускается молекулами зонда, находящимися в буфере, поскольку, как указывалось выше, в водных средах зонд имеет короткое время жизни, а его спектр флуоресценции существенно смещен в длинноволновую область.

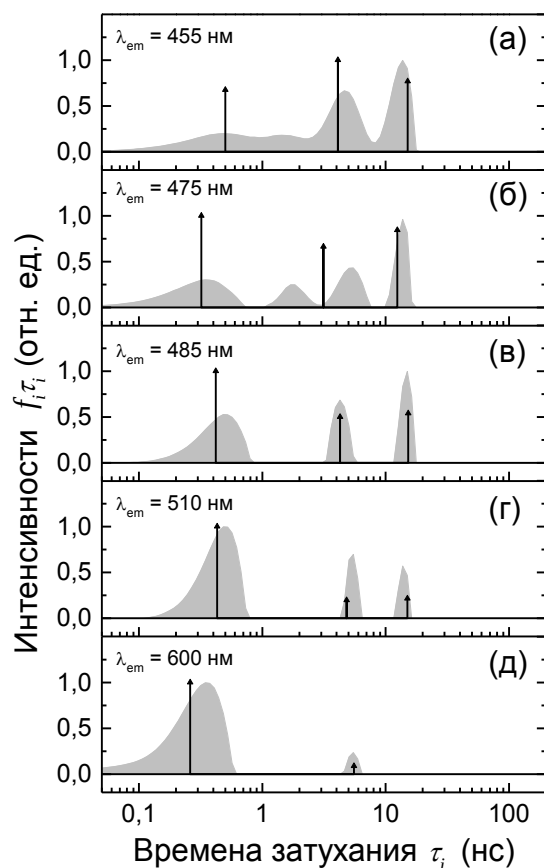


Рис. 1.13. Распределения времен затухания флуоресценции, восстановленные из кинетик флуоресценции 1,8-ANS в растворе оксигемоглобина человека в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 7,4. Для сравнения стрелками схематично представлены δ -функции, соответствующие результатам двух- и трехэкспоненциального анализа того же набора кинетик затухания флуоресценции. Длины волн регистрации λ_{em} = 455 нм (а), 475 (б), 485 (в), 510 (г) и 600 нм (д). Длина волны возбуждения λ_{ex} = 337,1 нм. $[HbA_1O_2]$ = 15 мкМ; $[1,8-ANS]$ = 10 мкМ; T = 20 °С.

но заряженными остатками Lys, His или Arg водорастворимых белков, такое взаимодействие 1,8-ANS с белками индуцирует формирование гидрофобного микроокружения для ароматических колец зонда, что заставляет его флуоресцировать.

Добавление ИНР в систему HbA_1O_2 –1,8-ANS приводит к резкому (в 1,75 раза) уменьшению вклада долгоживущей компоненты (11,7–12,3 нс)

Долгоживущие компоненты флуоресценции относятся к молекулам 1,8-ANS, связанным с оксигемоглобином. Центр связывания 1,8-ANS, характеризующийся временем жизни зонда $\sim 3,1$ –5,5 нс, по всей видимости, более доступен для молекул воды, присутствие которых приводит к снижению квантового выхода и времени жизни флуоресценции.

Компонента с длительностью затухания ~ 12 –15 нс относится к молекулам зонда, находящимся в гидрофобном неполярном окружении. Таким сайтом связывания 1,8-ANS в молекуле оксигемоглобина может быть центральная полость тетрамера.

Хорошо известно, что в гемоглобине человека HbA_1 N-концевые последовательности β -субъединиц, обращенные в центральную полость тетрамерной молекулы белка, содержат общий кластер из восьми положительных зарядов, представленных остатками Val NA1, His NA2, Lys EF6, His H21 в каждой β -цепи. Этот кластер представляет собой сайт связывания 2,3-дифосфоглицерата (DPG), а также ряда других отрицательно заряженных эффекторов, таких, как инозитолгексафосфат (ИНР) и хлорид-ионы.

Поскольку процесс связывания зонда в первую очередь определяется электростатическим взаимодействием его сульфонатной группы с положитель-

с одновременным увеличением (в 2,92 раза) вклада наиболее короткоживущей компоненты, относящейся к молекулам 1,8-ANS, находящимся в водной фазе (табл. 1.1). Такое перераспределение вкладов долгоживущей и короткоживущей компонент в затухании флуоресценции 1,8-ANS в присутствии ИНР может говорить только о том, что зонд способен взаимодействовать с оксигемоглобином в его центральной полости, а ИНР выступает в роли ингибитора связывания 1,8-ANS именно в DPG-связующем сайте [4].

Дополнительное доказательство способности 1,8-ANS взаимодействовать с оксигемоглобином в области, ответственной за регуляцию транспортной функции этого белка может быть получено при изучении связывания зонда с гликоформой $\text{HbA}_{1\text{C}}\text{O}_2$. Гемоглобин $\text{HbA}_{1\text{C}}$ представляет собой продукт посттрансляционной неферментативной реакции глюкозы с α -аминогруппами N-концевых остатков Val обеих β -цепей HbA_1 , а также остатками αLys99 , обращенными в центральную полость гемоглобина [5, 6].

Присоединение глюкозы по N-концевым остаткам Val β -цепей и присутствие фруктозамина, ковалентно связанного с ϵ -аминогруппой Lys99 α_1 -субъединицы в оксигемоглобине [6], приводит к снижению вклада компоненты с временем жизни 11,7–12,3 нс в 1,35 раза (табл. 1.1). Одновременно наблюдается практически трехкратный рост вклада наиболее короткоживущей компоненты. Следовательно, присутствующие в центральной полости тетрамерной молекулы гемоглобина $\text{HbA}_{1\text{C}}\text{O}_2$ дополнительные группировки, представленные фруктозамином, сами по себе играют роль «внутреннего» конкурентного ингибитора взаимодействия 1,8-ANS с этой минорной формой белка.

Сравнение относительных вкладов компонент затухания флуоресценции в системах HbA_1O_2 –1,8-ANS–ИНР и $\text{HbA}_{1\text{C}}\text{O}_2$ –1,8-ANS–ИНР показывает, что ИНР практически не влияет на амплитуду компоненты с временем жизни 11,7–12,3 нс и только на 30% увеличивает вклад короткоживущей компоненты (табл. 1.1).

Действительно, связывание ИНР в центральной полости оксигемоглобина человека характеризуется стабилизированием комплекса ИНР– HbA_1 водородными связями между ИНР и $\alpha_2\text{Arg141}$, $\alpha_1\text{Arg141}$, $\alpha_2\text{Lys99}$, $\alpha_1\text{Lys99}$ и молекулами воды, которые играют роль мостиков между эффектором и указанными аминокислотными остатками. Поскольку в $\text{HbA}_{1\text{C}}$ ковалентно связанный фруктозамин принимает участие в междимерном взаимодействии остатков $\alpha_1\text{Lys99}$ и $\alpha_2\text{Lys99}$ в составе тетрамера, присутствующий продукт Амадори неизбежно создает стерическое препятствие для связывания ИНР с $\text{HbA}_{1\text{C}}$ [6], что отражается в отсутствии влияния данного эффектора на амплитуду компоненты с временем жизни 11,7–12,3 нс.

Таким образом, подводя итог сказанному выше, можно утверждать, что в оксигемоглобине человека имеются два сайта связывания для 1,8-ANS, одним из которых является центральная регуляторная полость гемопротейда. Экспериментально доказать наличие двух сайтов связывания 1,8-ANS в молекуле оксигемоглобина можно также, используя стационарную флуоресцентную спектроскопию (см. лабораторные работы) путем обнаружения двух констант диссоциации (K_s) при титровании раствора гемоглобина растущими концентрациями 1,8-ANS.

Лабораторная работа № 1

Выделение оксигемоглобина человека методом ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе

Оборудование и материалы: спектрофотометр Shimadzu UV-VIS-2501 PC; жидкостный хроматограф; кюветы кварцевые; микропипетки автоматические.

Реактивы: DEAE-целлюлоза DE-52; изотонический раствор NaCl (0,155 M); калий-фосфатный буфер pH 7,4 (0,005 M); Tris-HCl буфер pH 7,0 (0,05 M); Tris-HCl буфер pH 8,5 (0,05 M); Tris-HCl буфер pH 8,7 (0,05 M).

Выделение и очистка гемоглобина HbA₁ осуществляется методом ионообменной хроматографии на колонке размером 5,2 × 40 см, наполненной DEAE-целлюлозой DE-52, которую предварительно уравнивают 0,05 M Tris-HCl буфером, pH 8,7.

1. Эритроцитарную пасту получают путем центрифугирования крови при 5000 g в течение 10 мин.

2. Осадок эритроцитов промывают переосаждением при 5000 g в течение 10 мин в изотоническом растворе NaCl (0,155 M), операцию повторяют 5 раз.

3. Лизис эритроцитов осуществляют в 0,005 M калий-фосфатном буфере pH 7,4. Для получения чистого, прозрачного раствора гемоглобина эритроцитарные мембраны осаждают центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин при 4 °C.

4. Перед нанесением на колонку препарат гемоглобина следует перевести из 0,005 M калий-фосфатного буфера pH 7,4 в 0,05 M Tris-HCl буфер pH 8,7 посредством диализа.

5. Элюцию колонки осуществляют линейным обратным градиентом pH от 8,5 до 7,0, который формируется 0,05 M Tris-HCl буфером с использованием градиентного смесителя. Процесс хроматографии контролируют по изменению оптической плотности на длине волны 280 нм детектора жидкостного хроматографа. Данный метод позволяет получать в гомоген-

ном состоянии основную форму гемоглобина взрослого человека – HbA₁, минорную форму HbA₂, а также удалять из препаратов органические фосфаты (рис. 1.14).

6. Концентрацию гемоглобина в периферической крови, а также на всех стадиях выделения и очистки определяют спектрофотометрически, используя для расчетов молярный коэффициент поглощения, равный $13,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 540 нм.

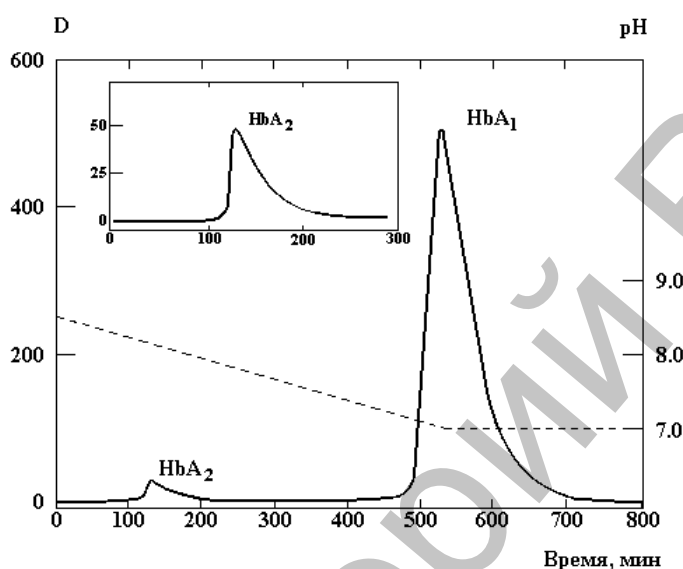


Рис. 1.14. Профиль элюции гемоглобинов HbA₂ и HbA₁ линейным обратным градиентом pH (8,5–7,0) 0,05 М Tris-HCl буфера.

Лабораторная работа № 2

Характеристика флуоресцентных свойств 1-анилино-8-нафталин-сульфоната (1,8-ANS) в водных растворах и растворе оксигемоглобина человека

Оборудование и материалы: спектрофлуориметр Shimadzu RF-5301; кюветы кварцевые; микропипетки автоматические.

Реактивы: раствор оксигемоглобина в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 7,4 (20 мкМ); водный раствор 1-анилино-8-нафталинсульфоновой кислоты (1,8-ANS) (2 мМ).

Добавление растущих концентраций зонда к раствору оксигемоглобина в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 7,4 приводит к снижению интенсивности белковой флуоресценции, сдвигу максимума люминесценции 1,8-ANS с 550 нм, что характерно для водного раствора зонда, до ~486 нм в присутствии оксигемоглобина и соответствующему увеличению интенсивности флуоресценции зонда в области 470–486 нм. Подобное увеличение интенсивности флуоресценции 1,8-ANS и коротковолновой сдвиг макси-

му в спектре флуоресценции относят к образованию комплекса зонда с белком.

Регистрация спектров флуоресценции осуществляется при 20 °С, в интервале 300–650 нм (длина волны эмиссии $\lambda_{\text{em}} = 486$ нм, длина волны возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 286$ нм).

1. В кварцевую кювету вносят 2 мл 20 мкМ раствора оксигемоглобина в 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,4 и записывают спектр собственной флуоресценции данного гемопротеида.

2. Аналогичным образом регистрируют спектр флуоресценции 4,98 мкМ раствора 1-анилино-8-нафталинсульфоокислоты (1,8-ANS) в 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,4. Для этого к 2 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера pH 7,4 добавляют 5 мкл 2 мМ раствора 1,8-ANS.

3. В кварцевую кювету, содержащую 2 мл раствора оксигемоглобина, добавляют с помощью микропипетки 5 мкл 2 мМ раствора 1,8-ANS в воде, раствор перемешивают и записывают спектр флуоресценции.

4. В ту же кювету далее добавляют последовательно 5, 10 и 20 мкл раствора 1,8-ANS, записывая спектры флуоресценции после каждого добавления раствора зонда. При этом суммарный объем находящегося в кювете раствора 1,8-ANS составит 10, 20 и 40 мкл, а его концентрация и отношение концентрации 1,8-ANS к концентрации белка изменятся, как показано в табл. 1.2.

Таблица 1.2 – Ход анализа

Суммарный объем раствора в кювете (мкл)	Объем раствора зонда в кювете (мкл)	Концентрация гемоглобина в растворе (мкМ)	Концентрация зонда в растворе (мкМ)	Отношение белок/1,8-ANS
2000	–	20	0	–
2002,5	2,5	19,97	2,49	8
2005	5	19,95	4,98	4
2010	10	19,9	9,95	2
2020	20	19,8	19,8	1
2040	40	19,6	39,2	0,5

5. В записанных спектрах флуоресценции отмечают величину интенсивности флуоресценции 1,8-ANS (в отн. ед.) в растворе оксигемоглобина при 486 нм. Данные оформляют в виде табл. 1.3. Вид спектров флуоресценции для проб с увеличением концентрации зонда должен изменяться, как показано на рис. 1.15.

Таблица 1.3 – Результаты

Конечная концентрация зонда в растворе, [1,8-ANS] (мкМ)	Значения интенсивности флуоресценции 1,8-ANS, I (отн. ед.)	$1/[1,8-ANS]$ (мкМ)	$1/I$ (отн. ед.)

6. Объяснить наблюдаемые изменения спектров собственной флуоресценции гемоглобина и смещение длинноволнового максимума в спектре флуоресценции 1,8-ANS в растворе оксигемоглобина в область коротких длин волн.

7. Используя данные, внесенные в табл. 1.3, построить график Лайнуивера–Берка (зависимость обратной величины интенсивности флуоресценции от обратной величины соответствующей концентрации 1,8-ANS) для расчета констант диссоциации (K_S) комплекса гемоглобин–1,8-ANS.

8. Путем несложных расчетов можно построить график Штерна–Фольмера, который служит надежным подтверждением образования комплекса между гемоглобином и 1,8-ANS.

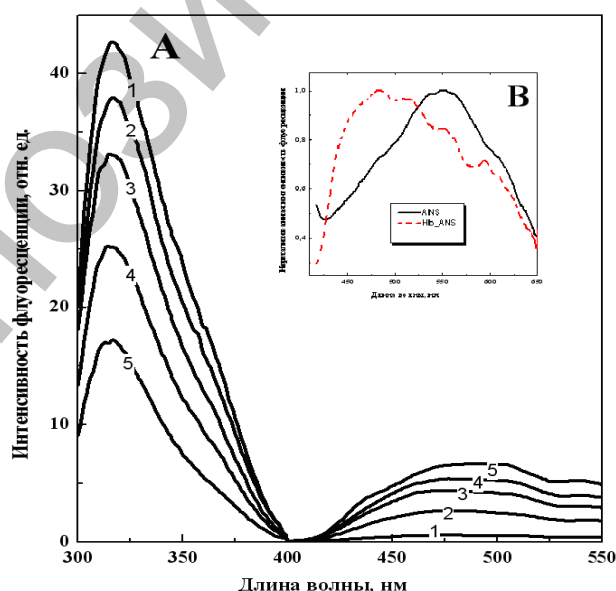


Рис. 1.15. А – спектры флуоресценции гемоглобина в 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,4, записанные при 20 °С в отсутствие 1,8-ANS (кривая 1) и в присутствии различных концентраций 1,8-ANS: 2 – 5 мкМ; 3 – 10 мкМ; 4 – 20 мкМ; 5 – 40 мкМ.

В – нормализованные спектры 1,8-ANS в отсутствие (—) и в присутствии (---) гемоглобина.

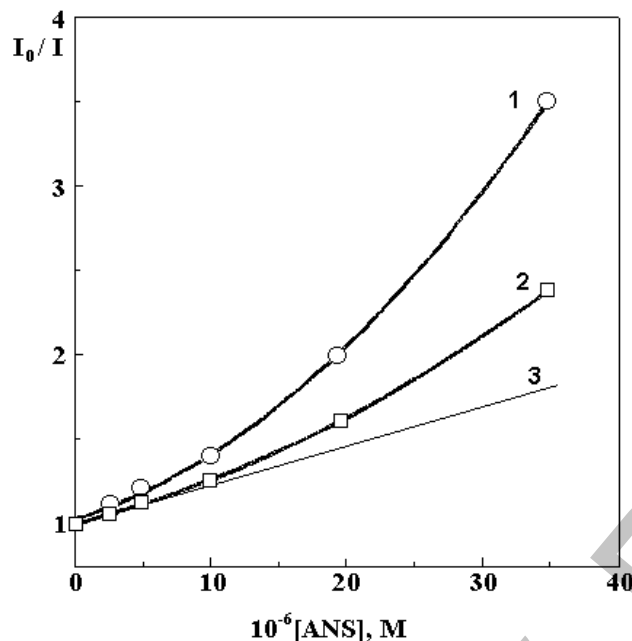


Рис. 1.16. Графическое представление тушения триптофановой флуоресценции оксигемоглобина зондом 1,8-ANS. I_0/I – отношение относительных интенсивностей собственной белковой флуоресценции гемоглобина в отсутствие (I_0) и в присутствии 1,8-ANS (I). $[\text{Hb}] = 15 \text{ мкМ}$, $[\text{ANS}] = 0 \div 19,9 \text{ мкМ}$. 1 – зависимость, построенная по измеренным интенсивностям, 2 – зависимость, построенная с учетом эффекта внутреннего фильтра на длинах волн возбуждения и испускания.

Исправленные интенсивности вычислены по уравнению, приведенному ниже, где $I_{\text{испр}}$ – исправленная интенсивность флуоресценции, $I_{\text{набл}}$ – измеренная интенсивность флуоресценции, $A_{\text{возб}}$ – поглощение на длине волны возбуждения, $A_{\text{исп}}$ – поглощение на длине волны испускания, 3 – рассчитанная зависимость параметра I_0/I от концентрации ANS в условиях эффекта внутреннего фильтра в отсутствие комплексообразования.

$$I_{\text{испр}} \approx I_{\text{набл}} \cdot 10^{(A_{\text{возб}} + A_{\text{исп}})/2}$$

Контрольные вопросы

1. Что подразумевается под понятием люминесценция?
2. Какие факторы могут вызвать явление люминесценции?
3. Какие молекулы могут обладать люминесценцией?
4. Что такое энергетический уровень молекулы?
5. Чем отличаются между собой возбужденные синглетные и триплетные состояния молекулы?
6. Что представляют собой релаксационные, внутриконверсионные и интеркомбинационные энергетические переходы в возбужденной молекуле?

7. *Чем отличаются между собой явления флуоресценции и фосфоресценции?*
8. *Что такое сдвиг Стокса?*
9. *Какой тип электронов ответственен за переход молекулы в возбужденное состояние?*
10. *Что такое квантовый выход флуоресценции?*
11. *Что такое спектр флуоресценции?*
12. *Какие аминокислоты, пептиды и белки обладают флуоресценцией?*
13. *Что такое природные и искусственные флуорофоры?*
14. *Что такое флуоресцентная метка или зонд и для чего они используются?*
15. *Какую информацию о структуре соединений можно получить, изучая их спектры флуоресценции?*

Литература

1. Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J.R. Lakowicz. – 2nd ed. – Kluwer Academic / Plenum Publishers, N. Y., 1999.
2. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – М.: Мир, 1986.
3. Parul, D.A. Time-resolved fluorescence reveals two binding sites of 1,8-ANS in intact human oxyhemoglobin / D.A. Parul, S.B. Bokut [et. al.] // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 2000. – Vol. 58, № 2–3. – P. 156–162.
4. Syakhovich, V.E. 1,8-Anilinoanthracene sulfonate binds to central cavity of human hemoglobin / V.E. Syakhovich [et. al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – Vol. 317, № 3. – P. 761–767.
5. Syakhovich, V.E. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human glycosylated haemoglobin / V.E. Syakhovich [et. al.] // Acta Crystallographica. F: Struc. Biol. Cryst. Commun. – 2006. – Vol. F62, № 2. – P. 106–109.
6. Saraswathi, N.T. Crystal structure of glycated human haemoglobin / N.T. Saraswathi [et. al.]. – Pdb3b75/pdb, last modified (REVDAT). – 2009–02–24.
7. Фрайфелдер, Д. Физическая биохимия / Д. Фрайфельдер. – М.: Мир, 1980.
8. Чан, Р. Физическая химия с приложениями к биологическим системам / Р. Чанг. – М.: Мир, 1980.

ГЛАВА 2. ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМОПРОТЕИНАМИ ПО ПЕРОКСИДАЗНОМУ МЕХАНИЗМУ, КАТАЛИЗИРУЕМАЯ ФЕНОЛ-СОДЕРЖАЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Принятые сокращения

Т – тиамин, ТМФ – тиаминмонофосфат, ТДФ – тиаминдифосфат, Тх – тиохром, ОДТх – оксодигидротиохром, ТДС – тиамин дисульфид, $^{+*}\text{Mb(IV=O)}$ – оксоферрильная форма миоглобина с радикалом на глобине (соединение I), Mb(IV=O) – оксоферрильная форма миоглобина (соединение II), $^{+*}\text{Hb(IV=O)}$ – оксоферрильная форма гемоглобина с радикалом на глобине (соединение I), Hb(IV=O) – оксоферрильная форма гемоглобина (соединение II), HRP – пероксидаза хрена, ЛП – лактопероксидаза, $\text{Tyr}^{\bullet}$ – тирозильный радикал, Tyr-Tyr – дитирозин, t-BHP – трет-бутилгидропероксид.

1. Введение

1.1. Окислительная трансформация тиамина и его гидрофобных метаболитов при окислительном и нитрозильном стрессе

Тиамин (или витамин B₁) является важнейшим незаменимым фактором питания и используется в организме в качестве структурного компонента молекулы тиаминдифосфата (ТДФ). Тиаминдифосфат (ТДФ) служит кофактором таких важнейших ферментов энергетического метаболизма, как пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа. ТДФ также является кофактором транскетолазы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла.

В последнее время наряду с выяснением механизмов основных реакций, в которых каталитическую роль играет ТДФ, стали накапливаться данные о высокой биологической активности некоферментных метаболитов тиамина. Недавно показано, что тиольная форма тиамина высвобождает из состава S-нитрозоглутатиона оксид азота, который вызывает релаксацию сосудов. Хотя антиоксидантная способность тиамина пока еще полностью не охарактеризована, ряд экспериментальных фактов свидетельствует о том, что тиамин может выступать в качестве антиоксиданта при окислительном и нитрозильном стрессе.

Показано, что дефицит тиамина и окислительный стресс вызывают повреждение и гибель нейронов. Повреждение нервной ткани сопровождается усилением синтеза оксида азота, протеканием реакций нитрования тирозина с образованием 3-нитротирозина на фоне дефицита тиамина.

Тиамин (особенно бенфотиамин, бензотиамин) предотвращает повреждение сосудов при сахарном диабете, предупреждает развитие нефропатий, снижает уровень токсических продуктов неэнзиматического гликозилирования белков. Одним из возможных механизмов защитного действия тиамин является его взаимодействие с пероксинитритом.

Как известно, токсический пероксинитрит образуется в биологических системах вследствие взаимодействия монооксида азота с супероксидом в быстрой практически диффузионно-контролируемой реакции после инкубации гликозилированных аминокислот с нитритом в аэробных условиях. Пероксинитрит очень эффективно нитрует остатки тирозина в различных ферментах и, таким образом, инактивирует их. Тиамин взаимодействует с тирозинильными радикалами и снижает как выход 3-нитротирозина, так и выход дитирозина. Показано, что не только тиамин, но и его гидрофобные производные тиохром и оксодигидротиахром являются ловушками пероксинитрита, разрушают токсичные оксоферрильные формы гемопротеинов. Вероятно, *гидрофобные метаболиты тиамин могут выполнять важную протекторную роль при окислительном и нитрозильном стрессе*, защищая нервную ткань, ингибируя реакции NO-зависимого нитрования тирозина, ингибируя образование дитирозина и межбелковых сшивок тирозин-тирозин.

При воздействии ультразвука на воду или водные растворы в атмосфере воздуха генерируются активные формы азота и кислорода. Тиамин окисляется в ультразвуковом поле под действием пероксинитрита, диоксида азота, гидроксильных радикалов с образованием тиохрома, оксодигидротиахрома, а также продуктов более глубокой деградации тиамин.

Ионы двухвалентной меди в присутствии аскорбиновой кислоты генерируют гидроксильные радикалы, которые окисляют тиамин в тиохром и другие продукты более глубокой деградации.

Гемопротеины (цитохром *c*, миоглобин, гемоглобин) играют важную роль в окислительных превращениях тиамин, развивающихся в ходе окислительного стресса. Окислительные превращения тиамин протекают в присутствии пероксида водорода и катализируются гемом и гемопротеинами. При взаимодействии пероксида водорода с ферри-формами миоглобина из сердца лошади, ферри-формами гемоглобина человека формируются высокореакционные оксоферрильные формы гемопротеинов, которые окисляют тиамин и его фосфорные эфиры до тиохрома, тиаминдисульфида и их фосфатов соответственно. Фенольные соединения на 1–2 порядка увеличивают выход продуктов окисления тиамин и его фос-

форных эфиров под действием оксоферрильных форм миоглобина или оксоферрильных форм гемоглобина.

Мы показали, что цитохром *c* из сердца лошади в присутствии пероксида водорода не только окисляет тиамин до тиохрома, но также эффективно (в отличие от других гемопротеинов) окисляет тиохром до оксодигидротиохрома. В кислой среде оксодигидротиохром трансформируется в оксотиамин, содержащий в своем составе пиримидиновый и тиазоловый компоненты, аналогично как у тиамина, и карбонильную группу СО на углероде метиленового мостика. При взаимодействии трет-бутилгидропероксида с гемопротеинами происходит не только образование оксоферрильных форм гемопротеинов, но и пероксидных и алкоксильных радикалов. Пероксидные радикалы окисляют тиохром до оксодигидротиохрома.

Гемопротеины фактически запускают при окислительном стрессе путь трансформации тиамина с образованием тиохрома и тиаминдисульфида и также продуктов окисления тиохрома, содержащих в своем составе карбонильные группы. Карбонилсодержащие метаболиты тиамина легко взаимодействуют с аминокетонами и сульфгидрильными группами аминокислотных остатков белков и могут модулировать их ферментативную активность.

Полученные результаты позволяют заключить, что трициклическая и тиольная формы тиамина, которые находятся в равновесии с тиазольной формой тиамина, легко окисляются оксоферрильными формами гемопротеинов, диоксидом азота, пероксинитритом, феноксильными и пероксидными радикалами до тиохрома, оксодигидротиохрома и тиаминдисульфида.

Как известно, выход цитохрома *c* из митохондрий и образование его оксоферрильных форм является одной из ключевых стадий в запуске апоптоза и последующей гибели клеток. Гидрофобный метаболит тиамина – тиохром, который легко проникает в клеточные мембраны, эффективно взаимодействует с диоксидом азота, восстанавливает оксоферрильные формы цитохрома *c* и тем самым может ингибировать развитие апоптоза. Наличие оксодигидротиохрома в крови, вероятно, может служить маркером, свидетельствующим об нитрозильном стрессе и предапоптическом состоянии некоторых тканей организма.

1.2. Тиохром, оксодигидротиохром и тиамин-дисульфид – продукты окислительной трансформации тиамина

Тиамин стабилен в кислой среде, в щелочной среде тиамин неустойчив и легко окисляется до тиохрома либо тиаминдисульфида. Тиохром, один из продуктов окислительной трансформации тиамина, обладает интенсивной флуоресценцией при 440 нм, что позволяет легко детектировать следовые количества витамина. Реакция окисления тиамина в тиохром по-

ложена в основу многих методов определения тиамин в крови, тканях, моче, пищевых продуктах, в медицинских препаратах и т.д.

В качестве окислителей тиамин могут быть использованы перманганат, бромциан, двуокись селена, феррицианид, перекись водорода, молекулярный иод или хлористая ртуть. Тиамин также окисляется в тиохром под действием гидроксильных либо пероксидных радикалов, а также в реакциях с пероксидазами.

Недавно показано, что тирозин и некоторые другие фенольные соединения на 1–2 порядка увеличивают выход тиохрома в пероксидазной реакции окисления тиамин, что позволяет использовать реакцию окисления тиамин в тиохром пероксидазами и гемопротеинами для определения концентрации гидропероксидов.

Определение уровня пероксида водорода, органических гидропероксидов, продуктов перекисного окисления липидов в биологических средах является важным диагностическим тестом, имеет огромное значение для медико-биологических применений, для контроля окружающей среды и качества пищевых продуктов.

Особенный интерес представляет определение низких, вплоть до пико- и наномолярных концентраций гидропероксидов в биологических средах в опытах *in vitro* и *in vivo*. Для измерения содержания пероксида водорода и органических гидропероксидов в водных растворах широко применяются электрохимические, хемилюминесцентные и флуоресцентные методы. Наиболее чувствительными из них являются флуоресцентные методы, основанные на регистрации интенсивно флуоресцирующих продуктов реакции гидропероксидов с индикаторными флуорогенными соединениями. Например, окислительное превращение нефлуоресцентного соединения Амплекс Красный (10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин) в интенсивно флуоресцирующий резорфин позволяет регистрировать концентрации H_2O_2 вплоть до 50 нМ.

Подобной чувствительностью обладает и метод, использующий в качестве флуорогенных соединений тиамин и его фосфорные эфиры. Образующиеся тиохром либо его фосфорные эфиры обладают интенсивной флуоресценцией, что позволяет детектировать следовые количества гидропероксидов.

Стационарная концентрация пероксида водорода в крови при нормальных условиях вследствие разрушения каталазой и глутатионпероксидазой не превышает 0,2 нМ. Однако, даже под действием этой низкой концентрации пероксида водорода метгемоглобин (или гемоглобин) окисляется с образованием феррильной формы гемоглобина с радикалом, локализованным на белковой глобуле.

Обе оксоферрильные формы гемоглобина – соединение I и соединение II – были обнаружены в крови при физиологических условиях.

Концентрация пероксида водорода в крови и тканях сильно возрастает при патологических состояниях, например, при ишемии/реперфузии, и может достигать 10 мкМ и выше в сердечной мышце при ишемии. Образующиеся оксоферрильные формы гемопротеинов являются токсичными соединениями и катализируют окисление многих низкомолекулярных соединений, генерируют свободные радикалы и ответственны за развитие целого ряда патологических состояний организма. Поэтому разработка высокочувствительных методов определения пероксидазной активности гемопротеинов представляет не только значительный научный интерес, но также имеет важное значение для практической медицины.

В данной главе изложены данные об окислении тиамин в присутствии пероксида водорода и трет-бутилгидропероксида гемсодержащими белками. Ферри-формы гемопротеинов – метмиоглобин и метгемоглобин, а также пероксидаза хрена и пероксидаза коровьего молока – в присутствии пероксидов окисляют тиамин до тиохрома, тиаминдисульфида. Оксоферрильные формы цитохрома с окисляют тиамин до оксодигидротиохрома и тиаминдисульфида. Приведенные результаты показывают, что измерение флуоресценции тиохрома является высокочувствительным методом определения активности пероксидаз в биологических системах. Представлены данные о фотофизических и флуоресцентных свойствах продуктов окислительной трансформации тиамин – тиохрома и оксодигидротиохрома. Кроме того, исследовано сопряженное пероксидазное окисление тиамин и фенольных соединений для ряда гемопротеинов и пероксидаз, продемонстрировано на ряде примеров, как можно использовать спектрально-флуоресцентные характеристики тиохрома для определения пероксидазной активности гемсодержащих белков (метMb, метHb, лактопероксидаза).

2. Материалы и методы

В работе использовали тиамин, тиаминмонофосфат (ТМФ), тиаминдифосфат (ТДФ), тиохром фирмы Сигма (США). Аминокислоты: L- и D-тирозин, D,L-аргинин, D,L-гистидин, D,L-валин, D,L-фенилаланин, L-серин, D-аспарагиновая кислота, D,L-треонин, а также феррицианид и гемин (Fluka (США)). Все другие реагенты высокой очистки производства России и Беларуси.

Оксигемоглобин получали из свежей донорской крови. Количество оксигемоглобина в растворе определяли, используя молярные коэффициенты поглощения ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$): $\epsilon_{412} = 125000$ или $\epsilon_{542} = 14250$. Метгемоглобин

получали добавлением 10–20-кратного молярного избытка феррицианида к оксигемоглобину. От избытка низкомолекулярных соединений отделялись методом гельфильтрации на сефадексе G-25. Концентрацию метгемоглобина определяли, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{630} = 3700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, pH 7,2. Оксоферрильные формы гемоглобина получали, добавляя 100–1000-кратные молярные избытки пероксида водорода к метгемоглобину. Полоса Соре метгемоглобина с максимумом при 407 нм, $\epsilon_{407} = 190000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ после добавления H_2O_2 смещалась до 418 нм, $\epsilon_{418} = 110000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, pH 7,5. Концентрацию метгемоглобина и оксоферрильных форм гемоглобина в растворе определяли, разлагая спектр поглощения смеси на индивидуальные спектры, используя метод наименьших квадратов. В качестве стандартов использовали спектры поглощения метгемоглобина и оксоферрильной формы гемоглобина. Концентрацию метмиоглобина в нейтральной или слабокислой средах определяли, измеряя оптическую плотность при 408 нм и 630 нм ($\epsilon_{408} = 188\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $\epsilon_{630} = 3900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), а при щелочном значении pH -9,5 использовали коэффициент поглощения для полосы Соре с максимумом при 411 нм, $\epsilon_{411} = 119\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Концентрацию оксоферрильных форм миоглобина определяли, измеряя поглощение при 421 нм ($\epsilon_{421} = 111\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

К раствору метмиоглобина (1–10 мкМ) добавляли 100–1000-кратный молярный избыток H_2O_2 в 0,05 М фосфатном буфере pH -7,0. После смешивания компонентов через 5–10 мин инкубации контролировали спектрофотометрически полноту образования оксоферрильной формы по положению полосы Соре. Избыток H_2O_2 разрушали, добавляя в раствор каталазу.

Концентрацию пероксида водорода определяли спектрофотометрически, используя молярные коэффициенты поглощения при 240 нм ($\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Концентрацию пероксида водорода в водных растворах определяли, также добавляя избыток KI. Концентрацию образовавшегося молекулярного иода определяли, используя коэффициент молярной экстинкции $26000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Дитирозин получали добавлением к 2 ммоль тирозина 10 мкмоль метмиоглобина и 2 ммоль пероксида водорода. Реакцию проводили в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,5. После инкубации реакционной смеси в течение 30 минут повторно добавляли пероксид водорода и снова инкубировали при комнатной температуре.

Образование дитирозина контролировали спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{315} = 5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, pH 7,5, а также флуоресцентным методом. Возбуждение флуоресценции проводи-

ли при длине волны 315 нм, а интенсивность флуоресценции измеряли при 410 нм. Образование остатков дитирозина в составе апо-миоглобина или апо-гемоглобина контролировали флуоресцентным методом после удаления гемина из состава гемопротеинов подкисленным ацетоном по методу Росси-Фанелли. Количество образовавшихся аддуктов гемина с апо-белком определяли спектрофотометрически, регистрируя оптическую плотность при 400 нм и 275 нм.

Концентрацию тирозина определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения $\varepsilon_{277} = 1500 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ или измеряя интенсивность флуоресценции с максимумом при 303 нм при длине волны возбуждения 280 нм.

Для выделения и очистки дитирозина раствор, содержащий метмиоглобин, тирозин, пероксид водорода и дитирозин, наносили на колонку $50 \times 1,5$ см с сефадексом G-25, уравновешенную 0,05 М фосфатным буфером pH 7,5. Перед нанесением на колонку избыток пероксида водорода удаляли, добавляя 0,1 мл каталазы (0,5 мг/мл) на 5 мл раствора. После элюции фосфатным буфером наблюдали выход трех отдельных неперекрывающихся пиков, принадлежащих соответственно гемопротеину, тирозину и дитирозину.

Флуоресцирующие продукты (тиохром и оксодигидротиохром), полученные после окисления тиамин пероксидом водорода в присутствии метгемоглобина, идентифицировали методом восходящей бумажной хроматографии (смесь n-бутанол-этанол-вода в соотношении 2:1:1). При pH 7,5 тиохром и оксодигидротиохром имеют максимумы поглощения 365 нм и 340 нм соответственно, максимумы флуоресценции при 450 и 440 нм соответственно.

Концентрацию тиохрома и оксодигидротиохрома определяли флуоресцентным методом. Поскольку их спектры эмиссии в значительной мере перекрываются, то спектр флуоресценции смеси этих соединений разлагали на индивидуальные спектры тиохрома и оксодигидротиохрома на основе метода наименьших квадратов. В качестве стандартов использовали коммерческий тиохром (Сигма, США) и оксодигидротиохром. Концентрацию тиаминдисульфида определяли после инкубации с избытками глутатиона и последующего окисления образовавшегося тиамин.

Для определения квантового выхода флуоресценции тиохрома и оксодигидротиохрома применялся сравнительный метод Вильямса. В качестве стандарта использовался раствор кумарина 1 в этаноле с квантовым выходом $\Phi = 0,73$ (в атмосфере азота). Спектры поглощения растворов были получены с помощью двухлучевого спектрофотометра SPECORD-200 PC

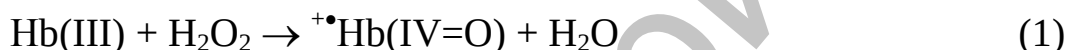
или SPECORD M40 (Analytik Jena, Германия). Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра СМ 2203 (Солар, Беларусь).

Кинетика затухания флуоресценции измерялась на импульсном флуориметре, описанном ранее. Анализ кривых затухания и определение параметров кинетики флуоресценции выполнялись с использованием пакета программ на основе метода Марквардта.

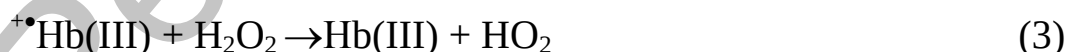
3. Результаты

3.1. Образование тиохрома, оксодигидротиохрома и тиаминдисульфида в процессе инкубации тиамина в водном растворе, содержащем метмиоглобин или метгемоглобин и пероксид водорода

После добавления избытка пероксида водорода к водному раствору, содержащему метгемоглобин, наблюдали образование оксоферрильных форм гемоглобина $^{+}\text{Hb}(\text{IV}=\text{O})$ (соединение I), а также $\text{Hb}(\text{IV}=\text{O})$ (или соединение II), что сопровождалось быстрым сдвигом полосы Соре в длинноволновую область спектра с 406 нм до 418 нм.



Коэффициент молярной экстинкции для полосы Соре оксоферрильных форм гемоглобина был ниже, нежели для полосы Соре метгемоглобина. Оксоферрильные формы гемоглобина быстро восстанавливались в метгемоглобин под действием пероксида водорода в течение 25–30 минут, а затем скорость восстановления оксоферрильных форм гемоглобина замедлялась (рис. 2.1). Это вызвано расходом пероксида водорода в реакциях взаимодействия с гемопротеином. Процесс восстановления оксоферрильных форм гемоглобина в метгемоглобин под действием пероксида водорода описывается реакциями 2 и 3.



В разбавленных растворах гемоглобина (1 мкМ и ниже) тетрамерная молекула гемоглобина диссоциирует на субъединицы.

Как видно из рис. 2.2, скорость восстановления оксоферрильных форм гемоглобина, диссоциированного на субъединицы, под действием пероксида водорода сильно снижена по сравнению с оксоферрильными

формами тетрамерной молекулы (рис. 2.1). Полоса Соре в разбавленных растворах метгемоглобина ($1,0 \text{ мкМ}$ или меньше) после добавления пероксида водорода лежит при 418 нм и не сдвигается в коротковолновую область за указанные промежутки времени (рис. 2.2), в отличие от более концентрированных растворов метгемоглобина в присутствии пероксида водорода.

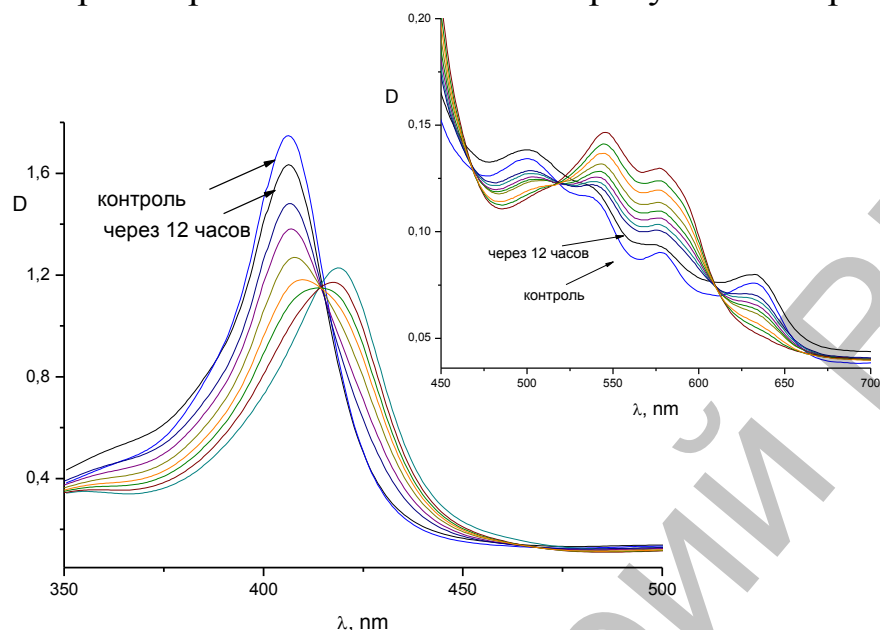


Рис. 2.1. Кинетика разрушения оксоферрильной формы гемоглобина, полученной вследствие взаимодействия метгемоглобина (10^{-5} М) с пероксидом водорода (10^{-2} М) в присутствии тиамин (10^{-4} М) в $0,05 \text{ М Na}^+$ -фосфатном буфере, $\text{pH } 7,4$, интервал $2,5 \text{ мин}$. В качестве контроля записан спектр поглощения метгемоглобина (10^{-5} М) в смеси с тиамином до добавления пероксида водорода.

В присутствии тиамин скорость образования метгемоглобина возрастала. Процесс разрушения оксоферрильной формы гемоглобина сопровождался окислением тиамин с образованием тioxрома.

После смешивания метгемоглобина с тиамином и пероксидом водорода в спектре поглощения раствора наблюдали образование новой полосы поглощения, с максимумом при $348\text{--}365 \text{ нм}$, принадлежащей продуктам окисления тиамин. На рис. 2.2 (область спектра $300\text{--}380 \text{ нм}$) показана кинетика изменения спектров поглощения растворов, содержащих метгемоглобин, тиамин и пероксид водорода после инкубации в течение различных промежутков времени. Выход продуктов окисления был малым и в спектре поглощения наблюдали образование очень слабой полосы поглощения (с максимумом при 370 нм), которую затруднительно регистрировать. Образование тioxрома, имеющего максимум поглощения в нейтральной среде при 370 нм , можно легко измерять флуоресцентным методом (рис. 2.3).

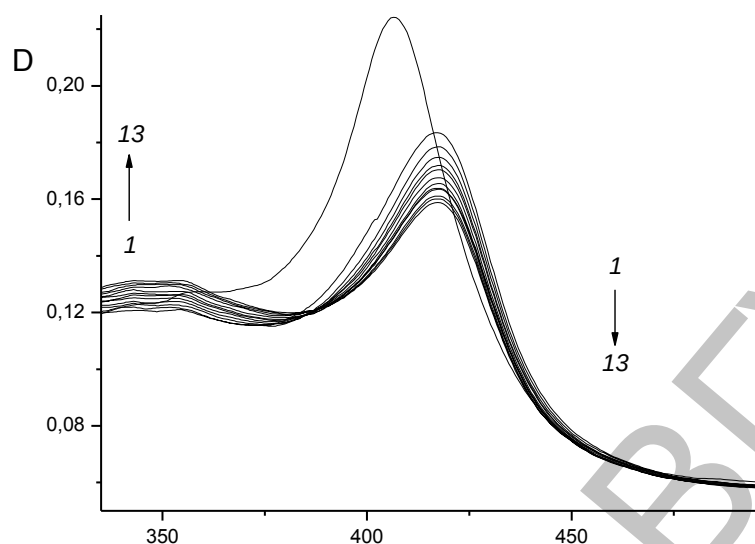


Рис. 2.2. Спектр поглощения смеси, содержащей метгемоглобин, тиамин в отсутствие пероксида водорода (1) и изменение спектра поглощения метгемоглобина и тиамина после добавления пероксида водорода, в зависимости от времени инкубации раствора (2–13). Каждую последующую запись спектра поглощения раствора проводили через 2 мин. Концентрация метгемоглобина 1 мкМ, тиамина 1 мМ, пероксида водорода 1 мМ, рН 7,5, 0,05 М калий-фосфатный буфер.

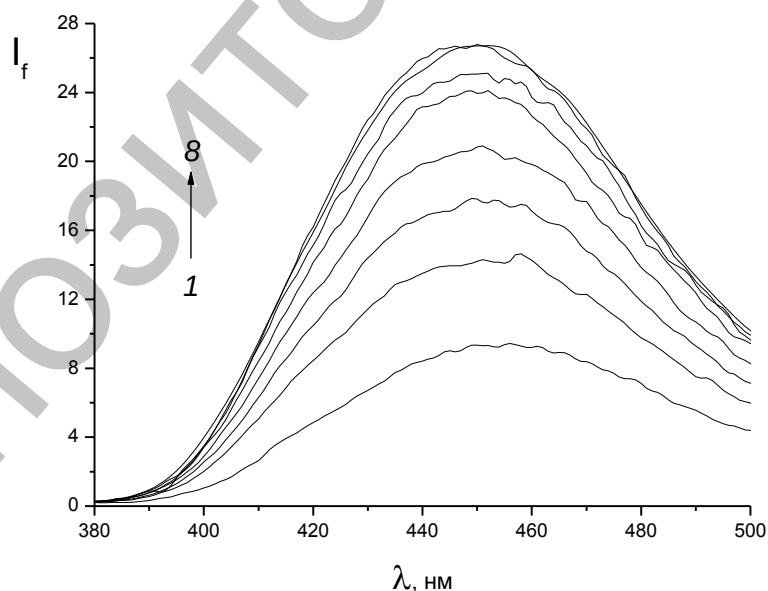


Рис. 2.3. Изменение спектров флуоресценции смеси, содержащей метгемоглобин, тиамин и пероксид водорода, в зависимости от времени инкубации раствора. Каждую последующую запись спектра флуоресценции раствора проводили через 2,5 мин. Концентрация метгемоглобина 1 мкМ, тиамина 1 мМ, пероксида водорода 1 мМ, рН 7,5, 0,05 М калий-фосфатный буфер. Длина волны возбуждения 365 нм и длина волны максимума флуоресценции 450 нм – соответствуют тioxрому.

Выход тиохрома (в мкмоль) после инкубации тиаминa с метгемоглобином и пероксидом водорода представлен в табл. 2.1.

Таблица 2.1 – Образование тиохрома после инкубации тиаминa в водных растворах, содержащих пероксид водорода и ферри-форму миоглобина, гемоглобина или цитохрома *c*. Концентрация гемопротеинов 10 мкМ, концентрация тиаминa 1,0 мМ, концентрация пероксида водорода 1,0 мМ. Время инкубации растворов 50 мин.

Состав реакционной смеси	Выход Тх (мкмоль)	Выход ОДТх (мкмоль)	Сумма концентраций Тх и ОДТх (мкмоль)
Hb(III) + T + H ₂ O ₂	0,5	–	–
Hb(III) + T + Тир + H ₂ O ₂	5,0(фл)	–	–
Mb(III) + T + H ₂ O ₂	0,2	–	0,2
Mb(III) + T + Тир + H ₂ O ₂	5,3	–	5,3
Cyt <i>c</i> + T + H ₂ O ₂	1,50	12,5	14,0
Cyt <i>c</i> + T + L-Tyr + H ₂ O ₂	27,0	11,5	38,5
Cyt <i>c</i> + T + Фенол + H ₂ O ₂	31,4	10,1	41,5

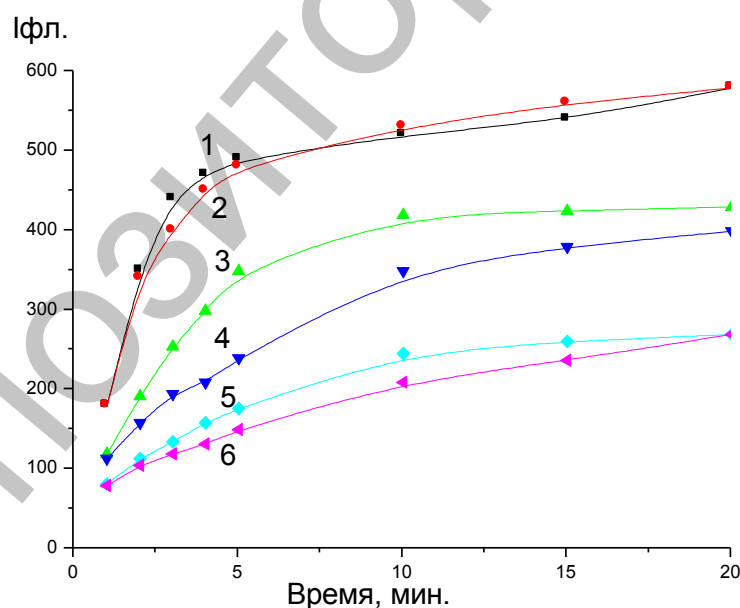


Рис. 2.4. Зависимость выхода тиохрома от концентрации пероксида водорода в растворах, содержащих метНв и тиамин в 0,05 М калий-фосфатном буфере, pH 7,1. Концентрация метНв (0,01 мМ), концентрация тиаминa (1 мМ). Концентрация пероксида водорода 1 – 0,625 мМ H₂O₂, 2 – 1,25 мМ H₂O₂, 3 – 2,5 мМ H₂O₂, 4 – 5 мМ H₂O₂, 5 – 10 мМ H₂O₂, 6 – 20 мМ H₂O₂. Флуоресценцию тиохрома измеряли при длине волны $\lambda_{\text{фл.}}=450$ нм, длина волны возбуждения $\lambda_{\text{воз.}}=450$ нм.

Тиохром имеет интенсивную флуоресценцию с максимумом при 450 нм, что позволяет легко регистрировать небольшие его концентрации, начиная с 0,1 мкМ. Методом восходящей хроматографии на бумаге показано, что основными продуктами окисления тиамин являются тиохром и тиаминдисульфид. Тиаминдисульфид не обладает заметной флуоресценцией, а спектр поглощения лежит в области длин волн короче 300 нм. Высокие концентрации пероксида водорода ингибировали образование тиохрома в растворе, содержащем метгемоглобин и тиамин (рис. 2.4). При концентрации пероксида водорода 0,5–1,0 мМ наблюдали максимальный выход тиохрома.

При смешивании метмиоглобина с пероксидом водорода так же, как и в случае гемоглобина, образуются оксоферрильные формы миоглобина.

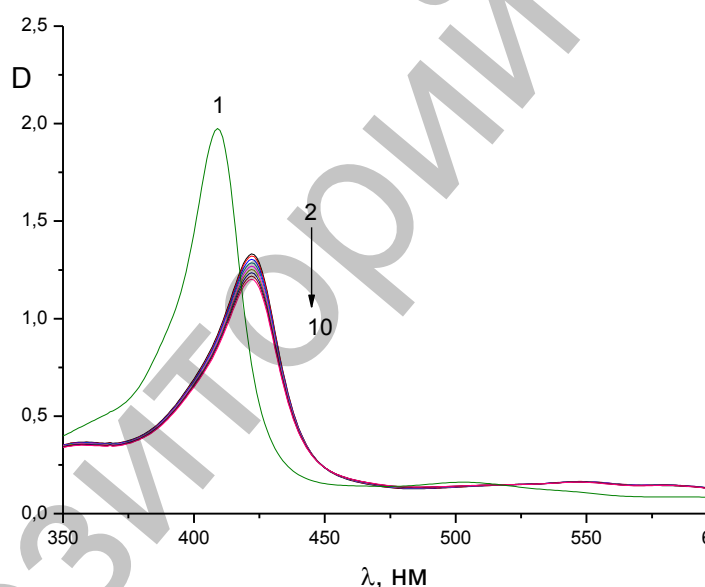


Рис. 2.5. Спектры поглощения метмиоглобина (1) и метмиоглобина после смешивания с пероксидом водорода (2–10) для разных времен инкубации. Интервал между записью 3 мин. Концентрация метмиоглобина (10 мкМ), H_2O_2 (5 мМ).

Образование оксоферрильных форм миоглобина сопровождается длинноволновым сдвигом полосы Core с 408 нм до 422 нм и снижением коэффициента молярной экстинкции (рис. 2.5). Однако в отличие от гемоглобина оксоферрильные формы миоглобина были более стабильными в течение продолжительных промежутков времени инкубации даже для концентрации белка 10 мкМ и выше. Таким образом, оксоферрильные формы миоглобина ведут себя схожим образом с разбавленными растворами гемоглобина, когда тетрамерная молекула гемоглобина диссоциирована на от-

дельные субъединицы. В растворах, содержащих метмиоглобин, пероксид водорода и тиамин, также наблюдали образование тioxрома (табл. 2.1). Кинетика образования тioxрома для различных концентраций тиамина приведена на (рис. 2.6).

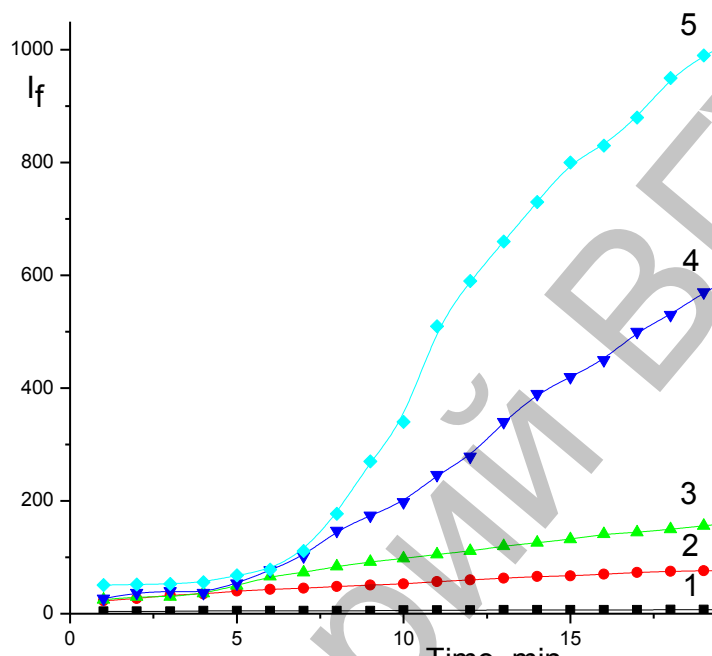


Рис. 2.6. Кинетика образования тioxрома в смеси с пероксидом водорода и различными концентрациями тиамина в зависимости от времени инкубации метмиоглобина в калий-фосфатном буфере 0,05 М, рН 7,4. Инкубационная смесь содержала: 1 мМ Т + 1 мМ H_2O_2 (1), 0,05 мМ Т + 10 мкМ метMb + 1 мМ H_2O_2 (2), 0,1 мМ Т + 10 мкМ метMb + 1 мМ H_2O_2 (3), 0,5 мМ Т + 10 мкМ метMb + 1 мМ H_2O_2 (4), 1,0 мМ Т + 10 мкМ метMb + 1 мМ H_2O_2 (5).

3.2. Окисление тиамина под действием оксоферрильной формы цитохрома с

После смешивания феррицитохрома с с пероксидом водорода в спектре поглощения смеси тиамина с ферри-цитохромом с наблюдали образование новой полосы поглощения с максимумом в области 340–350 нм, принадлежащей продуктам окисления тиамина. Разделение продуктов окисления тиамина методом восходящей хроматографии на бумаге свидетельствует о том, что в инкубационной смеси главным образом находится оксодигидротioxром и тиаминдисульфид, а тioxром присутствует в небольшом количестве. Тиаминдисульфид не обладает заметной флуоресценцией. В табл. 2.2 приведены структурные формулы тиамина и его продуктов окислительной трансформации в пероксидазных реакциях.

Квантовый выход флуоресценции оксодигидротioxрома более чем на порядок ниже, нежели у тioxрома, а спектр флуоресценции сильно перекры-

вается со спектром флуоресценции тиохрома. Максимум в спектре возбуждения оксодигидротиохрома лежит при 340 нм, а максимум флуоресценции при 440 нм. Поэтому регистрировать оксодигидротиохром флуоресцентным методом в присутствии сильно флуоресцирующего тиохрома трудно.

Таблица 2.2 – Структурные формулы тиамин и продуктов окислительной трансформации тиамин

Структурная схема	Название соединения
	Тиамин
	Тиохром
	Оксодигидротиохром
	Тиаминдисульфид

Спектрально-флуоресцентные свойства тиохрома и оксодигидротиохрома приведены в табл. 2.3.

Таблица 2.3 – Спектрально-флуоресцентные свойства тиохрома и оксодигидротиохрома в водном растворе при нейтральном значении рН среды и в этаноле

Название соединения	В воде				В этаноле			
	$\lambda_{abs},$ нм	$\lambda_{fl},$ нм	Φ	$\tau, нс$	$\lambda_{abs},$ нм	$\lambda_{fl},$ нм	Φ	$\tau, нс$
Тиохром	374	445	0,28	1,7	369	430	0,75	3,8
Оксодигидротиохром	349	444	0,03	–	351	415	0,3	1,8

Спектры поглощения тioxрома и оксодигидротioxрома представлены на рис. 2.7. Суммарный спектр поглощения в области 300–400 нм продуктов окисления тиаминa в пероксидазной реакции, катализируемой цитохромом *c*, представляет собой сумму спектров поглощения тioxрома и оксодигидротioxрома. Концентрации тioxрома и оксодигидротioxрома определяли, разлагая суммарный спектр продуктов окисления тиаминa оксоферрильными формами цитохрома *c* на отдельные компоненты.

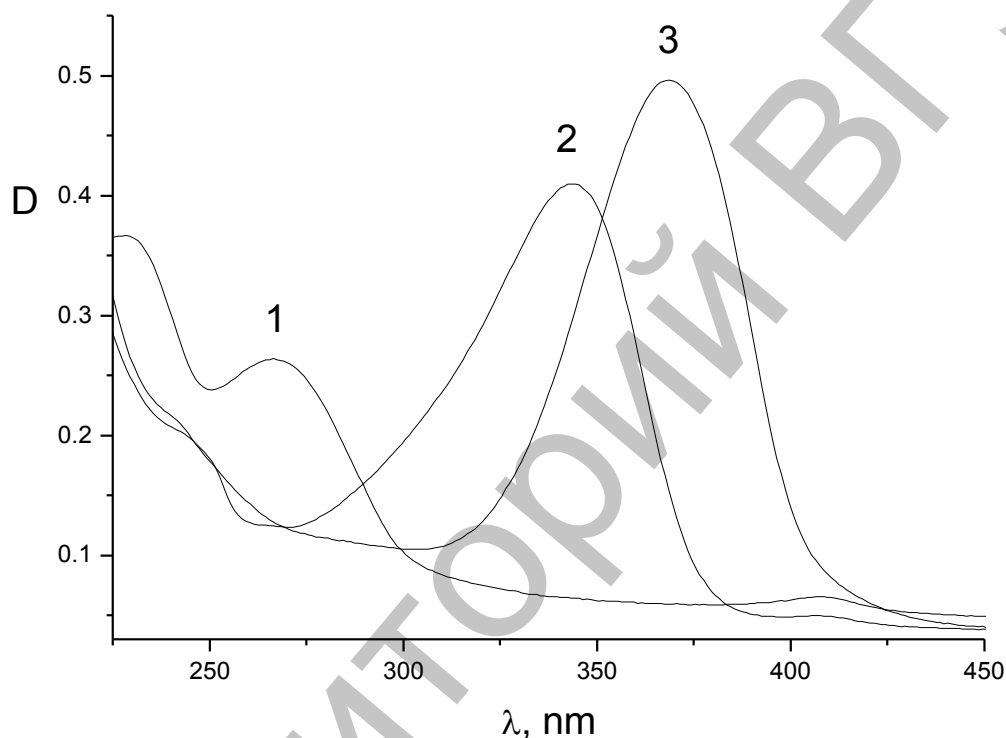


Рис. 2.7. Спектры поглощения тиаминa (1), ODTx (2), Tx (3) в водных растворах. Концентрация соединений равна 0,05 мМ, калий-фосфатный буфер 0,05 М, рН 7,0.

Положение максимума поглощения при 350 нм в спектре поглощения продуктов окисления тиаминa, образованных под действием оксоферрильных форм цитохрома *c* на тиамин, указывает на высокое содержание оксодигидротioxрома в растворе. Если тиамин инкубировали в растворе, содержащем метгемоглобин или метмиоглобин, в присутствии пероксида водорода, то наблюдали образование практически только тioxрома (табл. 2.1). Образование оксодигидротioxрома было характерным только для окисления тиаминa оксоферрильными формами цитохрома *c*. Следует отметить, что тioxром также окисляется до оксодигидротioxрома под действием ферри-цитохрома *c* и пероксида водорода. Оксоферрильные формы миоглобина и гемоглобина не взаимодействуют с тioxромом.

3.3. Фенольные соединения увеличивают выход тиохрома и дисульфида тиамин в процессе инкубации тиамин в водном растворе, содержащем ферри-гемопротеины и пероксид водорода

После добавления фенола к водным растворам, содержащим тиамин и оксоферрильные формы гемопротеинов, резко возрастал выход тиохрома, который является в этом случае практически единственным продуктом, ответственным за флуоресценцию. В присутствии высоких концентраций фенола выход тиохрома для раствора, содержащего тиамин, метмиоглобин и пероксид водорода, возрастает более чем в 120 раз (рис. 2.8), по сравнению с растворами без фенола.

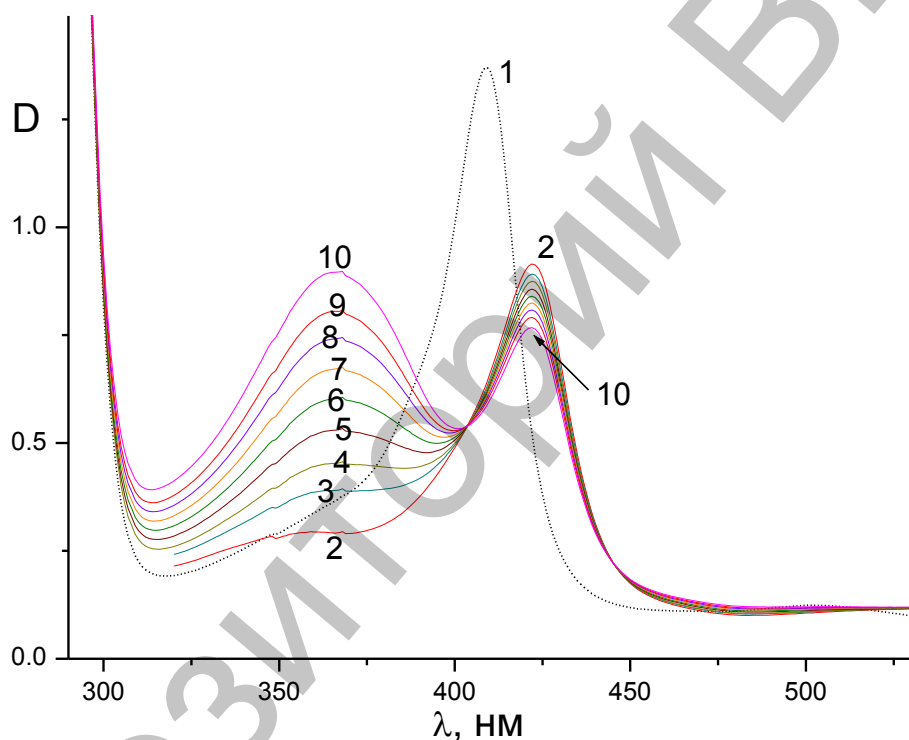
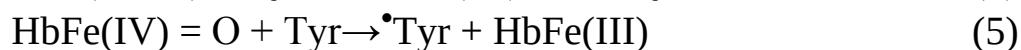
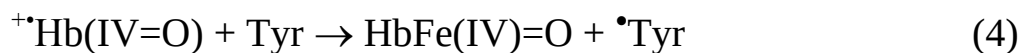
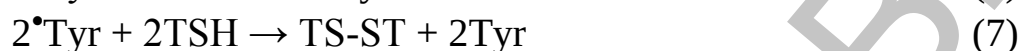


Рис. 2.8. Спектр поглощения смеси, содержащей метмиоглобин, тиамин, L-тирозин в отсутствие пероксида водорода (1), спектры поглощения смеси, содержащей метмиоглобин, тиамин, L-тирозин в присутствии пероксида водорода (2–10) в зависимости от времени инкубации раствора. Каждую последующую запись спектра поглощения раствора проводили через 6 мин. Концентрация метемиоглобина 10 мкМ, тиамин 1 мМ, тирозина 1 мМ, пероксида водорода 5 мМ, рН 7,5, 0,05 М калий-фосфатный буфер.

Тирозин и тирамин также на 1–2 порядка усиливают катаболизм тиамин. Тирозин, тирамин, салициловая кислота, а также другие фенольные соединения проникают в гемовый карман и восстанавливают оксоферрильный катион в ферри-катион. Например, в случае оксоферрильных форм гемоглобина эти реакции с тирозином можно представить следующим образом:



Образовавшиеся тирозильные и феноксильные радикалы окисляют тиамин до тioxрома и тиаминдисульфида. Ранее показано, что образование тioxрома происходит вследствие взаимодействия тирозильных и феноксильных радикалов с трициклической формой тiamина, а образование тиаминдисульфида вследствие взаимодействия тирозильных и феноксильных радикалов с тиольной формой тiamина.



На рис 2.9 и 2.10 приведены схемы протекания реакции окисления трициклической и тиольной форм тiamина под действием тирозильных радикалов.

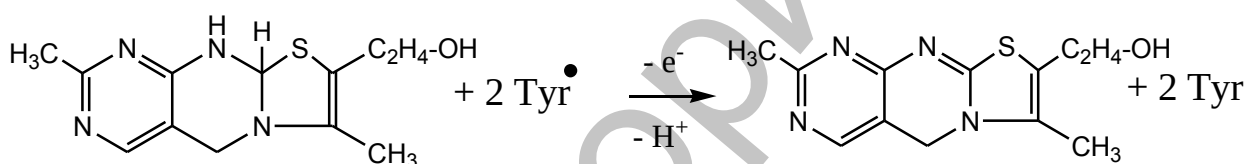


Рис. 2.9. Окисление трициклической формы тiamина в тioxром под действием тирозильных радикалов.

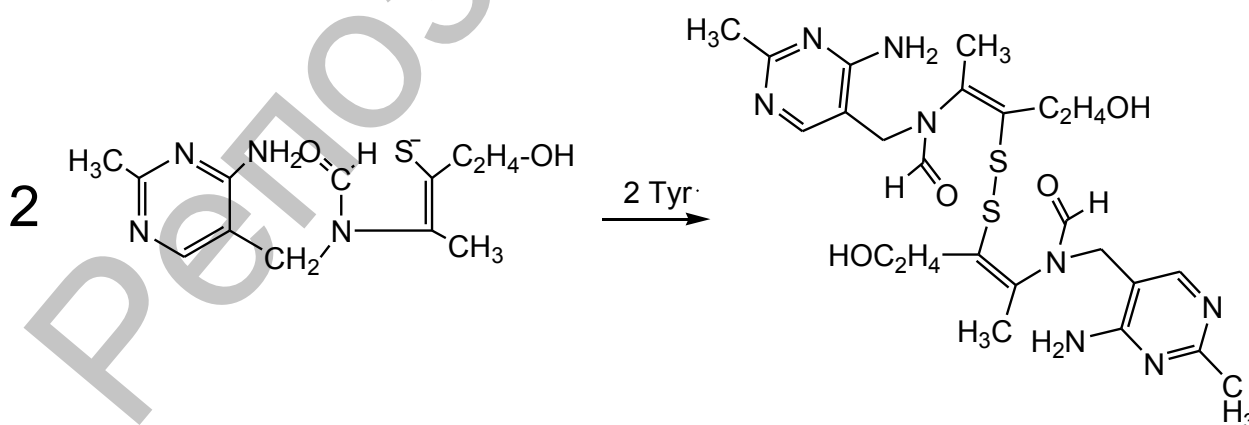


Рис. 2.10. Окисление тиольной формы тiamина в тиаминдисульфид под действием тирозильных радикалов.

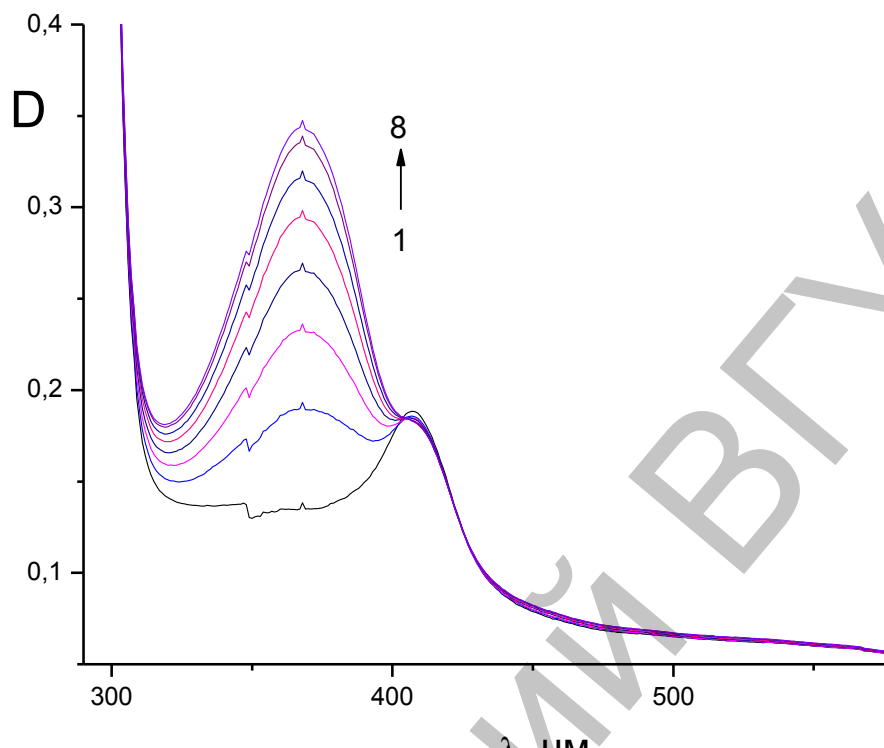


Рис. 2.11. Кинетика образования тиохрома под действием метгемоглобина в присутствии фенола, тиамин и пероксида водорода. Спектры поглощения записаны с интервалом 4 мин (1–8). Концентрация метНв (1 мкМ), фенола (0,1 мМ), тиамин (1 мМ) и пероксида водорода (1 мМ).

Фенольные соединения в случае пероксидазной реакции, катализируемой метгемоглобином, также увеличивают выход продуктов окисления тиамин и его фосфорных эфиров в растворах (рис. 2.11, табл. 2.4), по сравнению с такими же растворами в отсутствие фенола (рис. 2.2). Например, в присутствии высоких концентраций фенола, превышающих концентрацию метгемоглобина на два порядка, выход тиохрома возрастает почти в 50 раз (рис. 2.11). Однако выход продуктов окисления тиамин был ниже, нежели выход продуктов окисления тиамин в пероксидазной реакции, катализируемой миоглобином.

Как указывалось ранее, оксоферрильные формы цитохрома *c* (в отличие от оксоферрильных форм миоглобина и гемоглобина) окисляют тиамин до оксидигидротиохрома. Реакция протекает через стадию образования тиохрома. Фенол и фенольные соединения после добавления в раствор, содержащий цитохром *c*, пероксид водорода и тиамин, значительно увеличивали выход тиохрома (рис. 2.12, табл. 2.5) и ингибировали образование оксидигидротиохрома (табл. 2.1).

Таблица 2.4 – Изменение выхода тиохрома после инкубации тиаминa с ге-моглобином, пероксидом водорода в присутствии фенольных соединений

№ п/п	метНв(1 мкМ)+тиамин (1 М)+ +фенольное соединение или амини- кислота (2 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	значение рН	Выход Тх (мкМ) после	
			20 мин инкубации	40 мин инкубации
1	А = (метНв + Тиамин + H ₂ O ₂)	7,30	0,32	0,55
2	А + ацетилсалициловая кислота	6,78	0,63	0,92
3	А + салициловая кислота	6,50	1,20	1,56
4	А + D-тирозин	6,82	4,30	5,80
5	А + тирамин	7,31	3,70	4,80
6	А + фенол	7,27	6,70	8,10
7	А + D-тирозин + салициловая к-та	6,63	5,40	7,00
8	А + тирамин + салициловая к-та	7,04	5,80	7,30
9	А + L-триптофан + салициловая к-та	7,06	1,47	1,98
10	А + фенол + салициловая к-та	7,08	10,50	12,00
11	А + парацетамол	7,00	0,81	0,93
12	А + дофамин	7,00	0,04	0,05
13	А + кверцетин	7,00	0,05	0,06

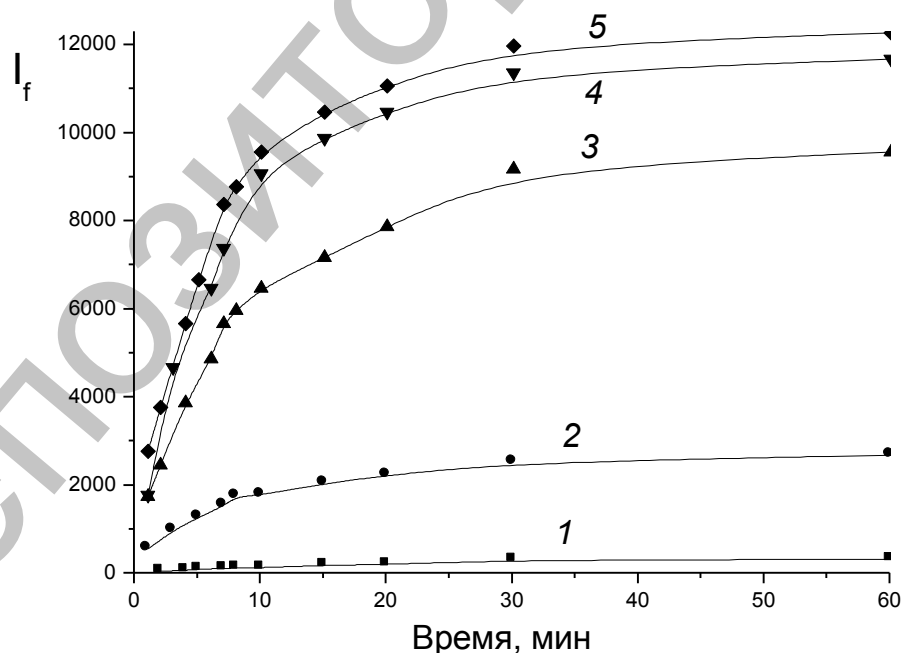


Рис. 2.12. Зависимость выхода тиохрома в пероксидазной реакции окисления тиаминa цитохромом с от концентрации тирозина. Концентрация пероксида водорода (5 мМ), тиаминa (1 мМ), цитохрома с (0,01 мМ). Концентрация тирозина в растворе (1) – 0 мМ, (2) – 0,1 мМ, (3) – 0,5 мМ, (4) – 1,0 мМ, (5) – 2,0 мМ.

При высоких концентрациях тирозина или фенола увеличение выхода тиохрома сопровождалось практически полным ингибированием образования оксодигидротиохрома. Суммарный спектр поглощения продуктов окисления тиамина в присутствии цитохрома *c* и фенола был сдвинут в коротковолновую сторону (рис. 2.13) по сравнению со спектром продуктов окисления тиамина оксоферрильными формами миоглобина (рис. 2.8) и гемоглобина (рис. 2.11) в присутствии фенола или фенольных соединений.

Таблица 2.5 – Изменение выхода тиохрома после инкубации тиамина с цитохромом *c*, пероксидом водорода в присутствии фенольных соединений и аминокислот

№	Состав растворов	мкМ
1	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	0, 21
2	Т (1 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	0,02
3	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ)	0,01
5	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ) + L-триптофан (2 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	0,52
9	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ) + салициловая к-та (2 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	0,37
11	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ) + L-лизин (2 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	0,21
12	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ) + L-цистеин (2 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	0,02
14	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ) + глутатион (2 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	0,02
5	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ) + L-тир. (2 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	7,8
8	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ) + тирамин (2 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	6,3
13	цитохром <i>c</i> (1 мкМ) + Т (1 мМ) + фенол (2 мМ) + H ₂ O ₂ (2 мМ)	2,6

Коротковолновый сдвиг спектра поглощения (рис. 2.13) свидетельствует о наличии оксодигидротиохрома среди продуктов окисления тиамина. Таким образом, в присутствии фенольных соединений усиливается окисление тиамина в тиохром под действием оксоферрильных форм миоглобина и гемоглобина. Для оксоферрильных форм цитохрома *c* в присутствии фенольных соединений также наблюдали увеличение образования тиохрома (рис. 2.12), но этот процесс сопровождался ингибированием образования оксодигидротиохрома (табл. 2.1).

Соединения, содержащие в своем составе дифенольные циклы, например, дофамин, кверцетин (табл. 2.4), напротив, ингибировали окисление тиамина оксоферрильными формами гемопротейна. Высокая ингибирующая эффективность кверцетина, рутина, ДОФА и биофлавоноидов отражает, во-первых, их большую реакционную способность при взаимодей-

ствии с оксоферрильным катионом гемина, нежели у монофенолов. Кверцетин, биофлавоноиды очень эффективно восстанавливают оксоферрильные формы гемопroteинов в ферри-формы.

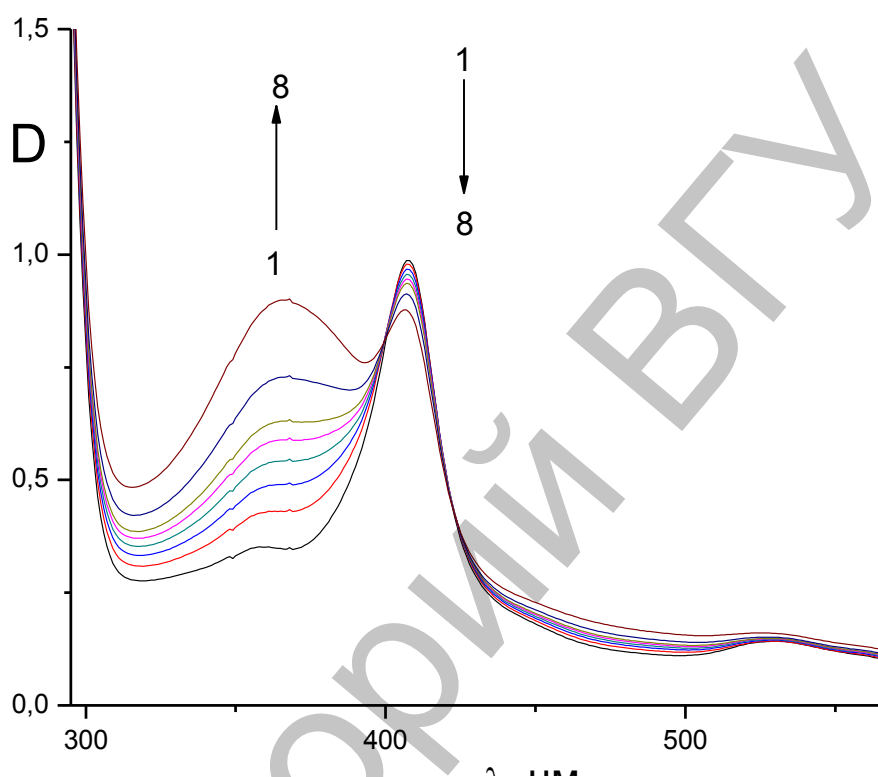


Рис. 2.13. Изменение спектров поглощения смеси, содержащей цитохром *c*, тиамин, фенол и H_2O_2 . Спектры поглощения (1–6) записаны с интервалом 4 мин, (7) с интервалом 30 мин и (8) с интервалом 50 мин. Концентрация цитохром *c* (10 мкМ), тиамин (1 мМ), фенол (1 мМ) и H_2O_2 (1 мМ).

Во-вторых, свободные радикалы кверцетина, биофлавоноидов, вероятно, не способны регенерироваться за счет окисления молекул тиамина, и поэтому для них не наблюдается сопряженное окисление совместно с тиамином.

Тиолы также сильно ингибировали окисление тиамина в тioxром, протекающее под действием оксоферрильных форм цитохрома *c* (табл. 2.5). Это связано с тем, что в присутствии цистеина или глутатиона происходит быстрое восстановление оксоферрильных форм цитохрома *c* до феррицитохрома *c*, а при избытке этих соединений до ферроцитохрома *c*. Кроме того, тиолы взаимодействуют с феноксильными радикалами и окисляются в дисульфиды. При повышении pH до 10,5–11,0 тиазольная форма тиамина превращается практически полностью в тиольную. В присутствии фенола или тирозина оксоферрильные формы гемопroteинов ускоряют

окисление тиамин в тиаминдисульфид. Поэтому можно предположить, что тиольная форма тиамин, которая образуется при повышении pH, также взаимодействует с феноксильными радикалами и окисляется в тиаминдисульфид. Пероксидаза хрена и пероксидаза коровьего молока окисляют тиамин до тиохрома и тиаминдисульфида. Каталаза окисляет тиамин в тиохром и тиаминдисульфид только в присутствии трет-бутилгидропероксида или других органических пероксидов, но не пероксида водорода. Вероятно, в этом случае протекает с низкой эффективностью процесс разрушения каталазой трет-бутилпероксида с образованием пероксильных радикалов, которые окисляют тиамин (табл. 2.6).

Таблица 2.6 – Влияние L- и D-форм тирозина на выход тиохрома в инкубационной смеси, содержащей ферри-формы гемопротеинов, тиамин и пероксиды. Время инкубации составляло 20 мин

Состав инкубационной смеси	Выход тиохрома, мкМ
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂	0,01
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 10 мкМ метHb	0,5
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 10 мкМ метHb + 2 мМ D-Tyr	5,1
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 10 мкМ метHb + 2 мМ D,L-Arg	0,23
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 10 мкМ метHb + 2 мМ D,L-Met	0,8
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 10 мкМ метMb	0,2
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 10 мкМ метMb + 2 мМ D-Tyr	5,3
1 мМ Т + 2 мМ H ₂ O ₂ + 1 мкМ HRP	0,09
1 мМ Т + 2 мМ H ₂ O ₂ + 1 мкМ HRP + 2 мМ L-Tyr	0,69
1 мМ Т + 2 мМ tBHP + 1 мкМ HRP	0,3
1 мМ Т + 2 мМ tBHP + 1 мкМ HRP + 2 мМ D-Tyr	6,2
1 мМ Т + 2 мМ tBHP + 1 мкМ HRP + 2 мМ L-Tyr	12,3
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 1 мкМ каталазы	0
1 мМ Т + 1 мМ tBHP + 10 мкМ каталазы	0,19
1 мМ Т + 1 мМ tBHP + 10 мкМ каталазы + 1 мМ L-Tyr	0,93
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 7,5 мкМ гемина	0,16
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 7,5 мкМ гемина + 1 мМ L-Tyr	1,7
1 мМ Т + 1 мМ H ₂ O ₂ + 7,5 мкМ гемина + 1 мМ D-Tyr	1,8
1 мМ Т + 1 мМ tBHP + 7,5 мкМ гемина	0,6
1 мМ Т + 1 мМ tBHP + 7,5 мкМ гемина + 1 мМ L-Tyr	3,0
1 мМ Т + 1 мМ tBHP + 7,5 мкМ гемина + 1 мМ D-Tyr	3,3

3.4. Лактопероксидаза коровьего молока катализирует окисление тиамина в тиохром в присутствии пероксида водорода и фенольных соединений

Лактопероксидаза осуществляет антимикробное действие в присутствии пероксида водорода. Лактопероксидаза молока (другие пероксидазы, например, пероксидаза хрена, а также миоглобин и гемоглобин) окисляет тирозин и фенольные соединения с образованием дитирозина и димеров фенольных соединений. На первой стадии реакции образуются тирозинильные или феноксильные радикалы. Между радикалами протекают реакции димеризации.

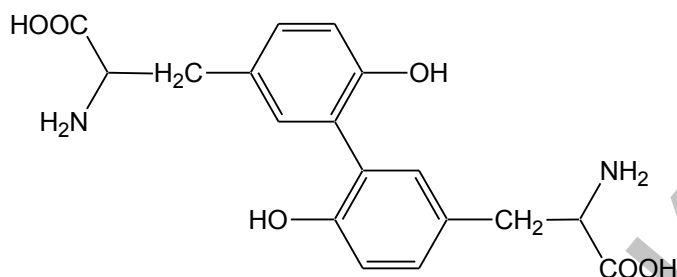


Рис. 2.14. Структурная формула дитирозина.

Дитирозин обладает характерным поглощением с максимумом при 320 нм в нейтральной среде (рис. 2.15).

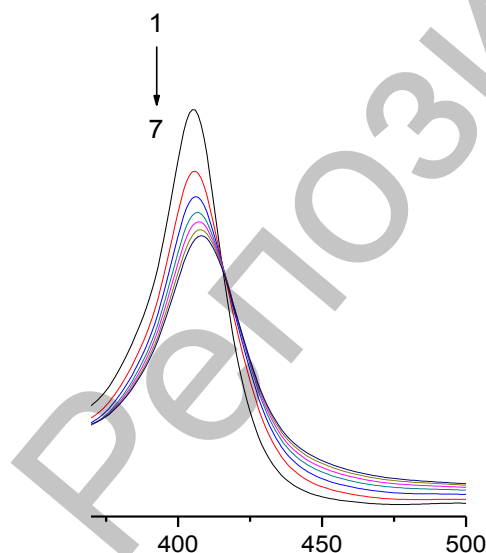


Рис. 2.15. Спектры поглощения растворов, содержащих 10 мкМ Мет – Нб, 1 мМ L-тирозина и 1 мМ трет-бутилпероксида через различные промежутки времени после смешивания. 1 – 0 мин, 2 – 3 мин, 3 – 6 мин, 4 – 9 мин, 5 – 12 мин, 6 – 15 мин, 7 – 18 мин после смешивания.

Эта реакция ответственна за образование межбелковых сшивок и инактивацию ферментов. Лактопероксидаза молока в присутствии Γ и H_2O_2 катализирует реакцию йодирования в белках остатков тирозина и гистидина. Вероятно, эти реакции, катализируемые лактопероксидазой лежат в основе механизма ее антимикробного действия. Миелопероксидаза полиморфно-ядерных лейкоцитов использует H_2O_2 и ион хлора для атаки фагцитированных бактерий через образование HOCl .

Лактопероксидаза коровьего молока незначительно окисляет тиамин в тиохром в присутствии пероксида водорода (рис. 2.16). Это связано с непроникновением тиамин в гемовый карман фермента. Тирозин и фенол легко проникают в гемовый карман и восстанавливают оксоферрильный катион в ферри-катион, а сами трансформируются в тирозильные и феноксильные радикалы соответственно.

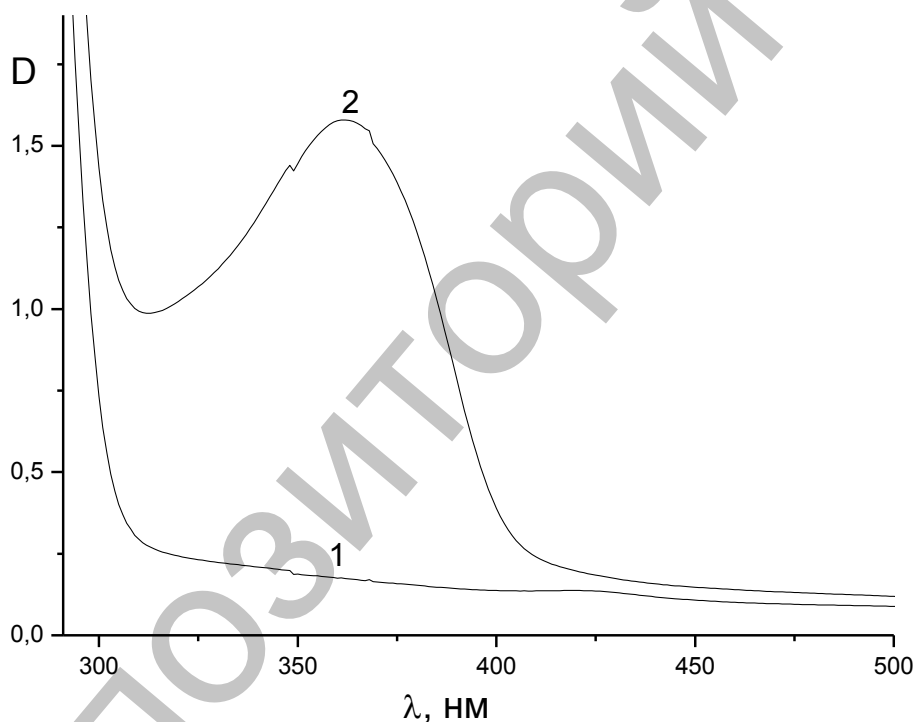


Рис. 2.16. Изменение спектров поглощения водных растворов, содержащих лактопероксидазу, тиамин, пероксид водорода (1), лактопероксидазу, тиамин, пероксид водорода, тирозин (2), после инкубации каждой смеси в течение 1-го часа. Концентрация лактопероксидазы равна 1 мкМ, концентрация тиамин – 1 мМ, концентрация тирозина – 2 мМ, концентрация пероксида водорода – 1 мМ.

Тирозинильные радикалы (или феноксильные радикалы) окисляют тиамин в тиохром (реакция 6, рис. 2.9).

Выход тиохрома определяется уровнем генерации тирозинильных или феноксильных радикалов и, следовательно, соответствует активности

лактопероксидазы молока. Тирозин и фенол увеличивали выход тиохрома в 10–100 раз по сравнению с растворами пероксидазы и тиамин в отсутствие фенолов (табл. 2.7).

Так, выход тиохрома возрастал в 30 раз после инкубации раствора тиамин с лактопероксидазой, пероксидом водорода и тирозином (рис. 2.16, 2.17, табл. 2.7).

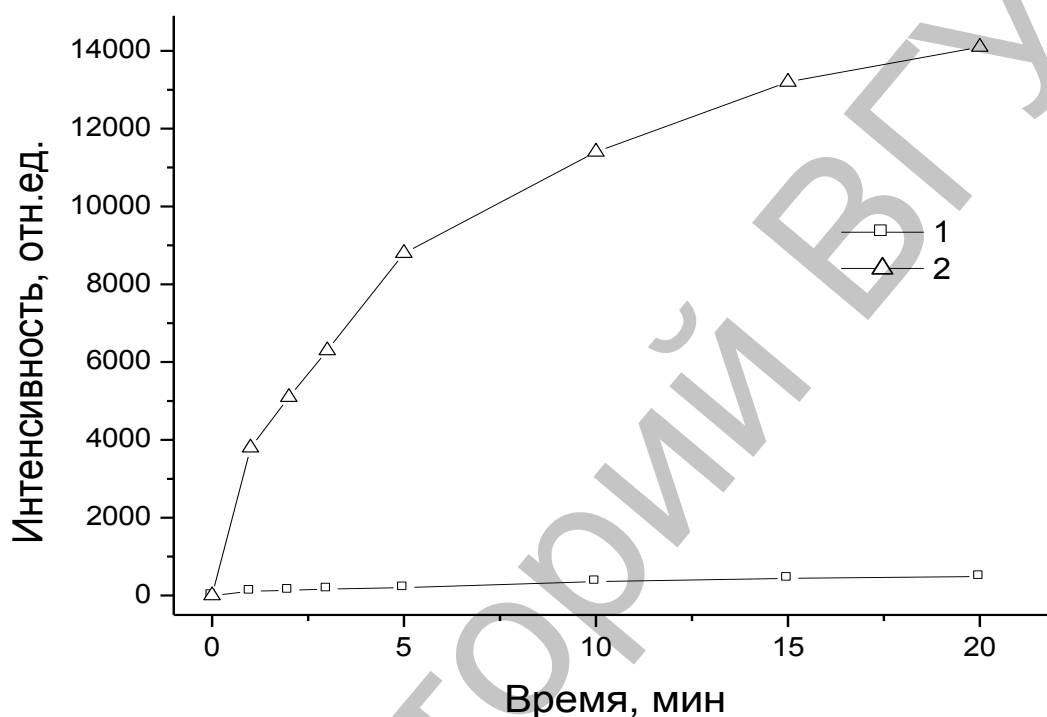


Рис. 2.17. Изменение интенсивности флуоресценции тиохрома после инкубации в течение различных промежутков времени лактопероксидазы с тиамин и пероксидом водорода в отсутствие (1) и в присутствии тирозина (2).

Полученные результаты показывают, что измерение флуоресценции тиохрома является высокочувствительным методом определения активности лактопероксидазы молока. Содержание лактопероксидазы в коровьем молоке составляет примерно 30 мг/литр или 0,36 мкМ. Мы показали, что совместное использование тиамин и тирозина позволяет определить концентрации лактопероксидазы вплоть до 0,1 мг/литр. Лактопероксидаза коровьего молока незначительно окисляет тиамин в тиохром в присутствии пероксида водорода. Тирозин и фенол (1 мМ) увеличивали выход тиохрома в 30 и 12 раз соответственно. Полученные результаты позволяют предположить, что быстрый и чувствительный метод определения антимикробных свойств молока по измерению флуоресценции тиохрома может найти использование в ветеринарии и медицине.

Таблица 2.7 – Изменение интенсивности флуоресценции тиохрома после инкубации в различные промежутки времени лактопероксидазы с тиамином и пероксидом водорода в отсутствие и в присутствии тирозина или фенола

Время инкубации, мин	Интенсивность флуоресценции, у.ед.		
	ЛП (1мкМ), тиамин (1мМ), H ₂ O ₂ (1мМ)	ЛП (1мкМ), тиа- мин (1мМ), Д-тирозин (2мМ), H ₂ O ₂ (1мМ)	ЛП (1мкМ), тиамин (1мМ), фенол (0,1мМ), H ₂ O ₂ (1мМ)
1	105	3800	600
2	135	5100	1500
3	165	6300	1900
5	201	8800	2400
10	360	11400	2940
15	440	13200	5000
20	490	14100	6000

3.5. Определение пероксидазной активности гемопротеинов по окислению тиамина, катализируемому фенол-содержащими соединениями

3.5.1. Определение пероксидазной активности ферри-форм миоглобина или гемоглобина

Сопряженное пероксидазное окисление тиамина и замещенных монофенолов, катализируемое ферри-формами миоглобина и гемоглобина, характеризуется резким ростом скорости окисления тиамина (рис. 2.8, рис. 2.11). Поэтому определение пероксидазной активности метмиоглобина или метгемоглобина можно легко проводить методом абсорбционной спектроскопии. Для работы используют обычно водные растворы гемопротеинов в концентрации 1–10 мкМ. Затем к растворам ферриформ гемопротеинов добавляют 10–100 кратный молярный избыток (по гемину) тиамина, фенола (или тирозина) и пероксида водорода. Для полученной смеси измеряют оптическую плотность D_0 на длине волны 370 нм в стандартной 1-см кювете. Затем смесь инкубируют в течение 25–30 минут при комнатной температуре. Повторно измеряют значение оптической плотности D_1 на длине волны 370 нм. Определяют прирост оптической плотности за время инкубации растворов $\Delta D = D_1 - D_0$. Концентрацию образовавшегося тиохрома в моль/литр определяют по формуле

$$C = \Delta D / 20400(M) \quad (9)$$

3.5.2. Методика определения лактопероксидазы в коровьем молоке

3.5.2.1. Обнаружение пероксидазы молока

В 2 пробирки наливают по 1 мл свежего сырого молока. В первую пробирку добавляют раствор тиамин с конечной концентрацией в растворе 1 мМ, затем добавляют пероксид водорода с конечной концентрацией 1 мМ. Во вторую пробирку кроме пероксида водорода и тиамин дополнительно добавляют тирозин (L- или D-форма) до конечной концентрации 1 мМ. Затем пробирки инкубируют при комнатной температуре 60 мин или обе пробирки помещают в водяную баню и инкубируют при 37 °С в течение 30 мин. После инкубации содержимое обеих пробирок разбавляют в 50–100 раз фосфатным буфером 0,05 М, рН 7,0–7,4 и измеряют интенсивность флуоресценции тиохрома. Превышение интенсивности флуоресценции тиохрома в растворе, содержащем дополнительно тирозин, свидетельствует об активности пероксидазы. Ферментативными свойствами обладает только свежее молоко, при кипячении или пастеризации фермент быстро разрушается. Реакцией на лактопероксидазу можно отличить сырое молоко от пастеризованного.

3.5.2.2. Количественное определение активности пероксидазы молока

Свежее сырое молоко центрифугируют при 3000–5000 оборотов/мин для удаления жира. После удаления жира молоко разбавляли водой в объемном соотношении 1:2, 1:5, 1:10. В каждую пробу добавляли тиамин до конечной концентрации 1,0 мМ, фенол – 0,1 мМ и пероксида водорода 1,0 мМ.

Пробы инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Белки осаждали добавлением 20% ТХУ. Затем пробы центрифугировали при 3000 в течение 15 минут. Значение рН надосадочной жидкости доводили до нейтрального добавлением NaOH, затем объем проб доводили до 5 мл добавлением фосфатного буфера рН 7,0 0,05 мМ. Для каждой пробы измеряли интенсивность флуоресценции тиохрома (длина волны возбуждения равна 365 нм, длина волны флуоресценции 445 нм). Для определения концентрации образовавшегося тиохрома использовали флуоресценцию стандартного раствора тиохрома. Результаты приводятся в табл. 2.8.

Мы показали, что ферри-формы гемопротеинов – метмиоглобин и метгемоглобин, а также пероксидаза хрена и пероксидаза коровьего молока в присутствии пероксида водорода окисляют тиамин до тиохрома и тиаминдисульфида. Каталаза окисляет тиамин с образованием тиохрома и тиаминдисульфида только в присутствии трет-бутилгидропероксида или других органических пероксидов, но не пероксида водорода. Цитохром с из сердца лошади в присутствии пероксида водорода не только окисляет

тиамин до тиохрома, но также эффективно (в отличие от других гемопротеинов) окисляет тиохром до оксодигидротиохрома. Сопряженное пероксидазное окисление тиамин и замещенных фенолов характеризуется разнонаправленным действием различных фенолов на окисление тиамин и его производных.

Таблица 2.8 – Зависимость выхода тиохрома в реакции сопряженного окисления тиамин и тирозина, катализируемого лактопероксидазой сырого коровьего молока, при различном разбавлении молока водой

Состав инкубационной смеси	Время инкубации смеси до добавления ТХУ (мин)	Осаждение белков молока ТХУ (20%)	Значение pH надосадочной жидкости	Концентрация образовавшегося тиохрома (мкМ)
Молоко–вода объемное соотношение 1:5+ тиамин + тирозин + пероксид водорода	30	+	6,68	5,10
Молоко–вода объемное соотношение 1:5 + тиамин + тирозин + пероксид водорода	30	+	7,32	2,35
Молоко–вода объемное соотношение 1:10 + тиамин + тирозин + пероксид водорода	30	+	6,98	1,19

Пероксидазное окисление одних пар тиамин–фенолы характеризуется большим ростом скорости окисления тиамин, в то время как окисление других пар отличается четко выраженным ингибированием окисления тиамин. Например, наблюдали активацию пероксидазного окисления тиамин для пар Т–фенол, Т–тирозин, Т–тирамин, Т–салициловая кислота, Т–парацетамол. Фенол, тирозин, тирамин на 1–2 порядка увеличивают выход продуктов окисления тиамин и его фосфорных эфиров под действием

оксоферрильных форм миоглобина или оксоферрильных форм гемоглобина, а также каталазы и пероксидаз. В данном случае реализуется регенерация фенола и других монофенольных соединений за счет окисления тиамина и его производных. Кверцетин, ДОФА, биофлавоноиды, напротив, полностью ингибируют окисление.

Высокая ингибирующая эффективность кверцетина, рутина, ДОФА и биофлавоноидов отражает, во-первых, их большую реакционную способность при взаимодействии с оксоферрильным катионом гема, нежели у монофенолов. Во-вторых, свободные радикалы кверцетина, биофлавоноидов, вероятно, не способны регенерироваться за счет окисления молекул тиамина, и поэтому для них не наблюдается сопряженное окисление совместно с тиамином.

Полученные результаты показывают, что измерение флуоресценции тиохрома может явиться высокочувствительным методом определения активности каталазы и пероксидаз, а также пероксидазной активности ферриформ гемопротеинов.

Контрольные вопросы

1. *Как осуществляется окислительная трансформация тиамина и его производных метаболитов при окислительном и нитрозильном стрессе?*
2. *Назовите продукты окислительной трансформации тиамина.*
3. *Какие вещества образуются при инкубации тиамина в водном растворе, содержащем метмиоглобин или метгемоглобин и пероксид водорода?*
4. *Каков механизм окисления тиамина оксоферрильной формой тиохрома с ?*
5. *Как влияют фенольные соединения на выход тиохрома и дисульфида тиамина при инкубации тиамина в водном растворе, содержащем ферри-гемопротеины и пероксид водорода?*
6. *В каких условиях лактопероксидаза катализирует окисление тиамина в тиохром?*
7. *Опишите принцип метода определения пероксидазной активности гемопротеинов по окислению тиамина.*
8. *Как определяется пероксидазная активность ферри-форм миоглобина и гемоглобина?*
9. *Опишите принцип метода определения активности лактопероксидазы молока.*

Работа выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований (грант БР08-216) и Министерства образования РБ (проект 03-09).

Литература

1. Степуρο, А.И. Роль тиольной формы тиамина в обмене оксида азота / А.И. Степуρο, Т.П. Пилецкая, И.И. Степуρο // Биохимия. – 2005. – Т. 70. – С. 416–429.
2. Stsiapura, V. Antioxidant Properties of Thiamine and its Hydrophobic Metabolites / V. Stsiapura, I. Stepuro // Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects, NovaPublishers, 2010. – P. 319–376.
3. Stepuro, I.I. Thiamine and vasculopathies / I.I. Stepuro // PLEFA. – 2005. – Vol. 72. – P. 115–127.
4. Степуρο, А.И. Тиамин ингибирует образование дитиозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина / А.И. Степуρο [и др.] // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 9. – С. 1281–1293.
5. Степуρο, И.И. Образование S-нитрозоглутатиона и S-нитрозоцистеина при воздействии ультразвука на водные растворы глутатиона и цистеина в атмосфере воздуха / И.И. Степуρο [и др.] // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 1645–1658.
6. Степуρο, И.И. Образование оксида азота при воздействии ультразвука на воду и водные растворы / И.И. Степуρο, Р.И. Адамчук, В.И. Степуρο // Биофизика. – 2004. – Т. 49. – С. 773–780.
7. Степуρο, И.И. Окислительная трансформация тиамина, катализируемая ионами меди и аскорбиновой кислотой / А.И. Степуρο, Т.П. Пилецкая, И.И. Степуρο // Биохимия. – 1997. – Т. 62, вып. 12. – С. 1648–1654.
8. Юденфренд, С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине / С. Юденфренд. – М.: Мир, 1965. – 484 с.
9. Штерн, Э. Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии / Э. Штерн, К. Тиммонс. – М.: Изд-во Мир, 1964. – С. 74–222.
10. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – М.: Изд-во Мир, 1986.

ГЛАВА 3. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД В ОТКРЫТИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕМОЛИМФЫ КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

1. Активные кислородные метаболиты

В основе многих заболеваний человека и животных лежат изменения структурно-функциональных свойств белков, нуклеиновых кислот, биомембран под действием факторов внешней среды физической, химической, биологической природы. К таким факторам могут быть отнесены ионизирующее и УФ-излучения, токсины, яды, фармакологические агенты, аллергены, патогенные микроорганизмы. В качестве ключевых агентов в организме, обуславливающих развитие патологии, могут выступать свободные радикалы и активные кислородные метаболиты (АКМ) [1–3]. К настоящему времени доказана связь развития более 100 заболеваний с избыточным образованием АКМ и свободных радикалов. Среди них сердечно-сосудистые, ревматоидный артрит, бронхиальная астма, атеросклероз, поражение печени, хронический панкреатит, нейродегенеративные и онкологические заболевания [1, 4–6]. В связи с этим создаются лекарственные препараты с антиоксидантным действием, проводится исследование про- и антиоксидантных свойств веществ различного происхождения.

Свободные радикалы и АКМ обладают высокой реакционной способностью, коротким временем жизни, поэтому их непосредственный химический анализ практически невозможен. В табл. 3.1 приведены некоторые данные, характеризующие АКМ.

Таблица 3.1 – АКМ в организмах млекопитающих: образование, свойства, утилизация [2–4, 8]

Форма АКМ, время жизни, радиус действия	Механизмы образования в живых системах	Биологическое действие	Ингибиторы
1	2	3	4
Супероксидный анион-радикал, O_2^- , 10^{-6} с, 0,3 мкм	Одноэлектронное восстановление кислорода ксантиноксидазой, НАДФН-оксидазой фагоцитов, оксидазами аминокислот;	Индукция перекисного окисления липидов (ПОЛ); образование H_2O_2 , $HO\cdot$, $^1O_2$, $HO_2\cdot$; разрушение мембран эритроцитов, усиление	Супероксиддисмутаза, аскорбиновая кислота, церулоплазмин, глутатион, фенолы

Продолжение табл. 3.1

1	2	3	4
	образование в цепи транспорта электронов митохондрий и микросом; окисление гемоглобина	пролиферации лимфоцитов, вазомоторное действие, регуляторное действие	
Пергидроксильный радикал, $HO_2^\bullet$, 10^{-3} с, 10 мкм	Присоединение H^+ к O_2^- в кислой среде, реакция H_2O_2 с органическими пероксидами, промежуточный продукт в реакциях восстановления флавинов с O_2	Индукция ПОЛ, цитотоксическое действие, образование H_2O_2 и O_2^- при взаимодействии с органическими молекулами	Аскорбиновая кислота, мочевая кислота, убинон, α -токоферол
Пероксид водорода H_2O_2 , стабилен	Двухэлектронное восстановление кислорода ксантиноксидазой и флавиновыми оксидазами, реакция дисмутации O_2^- с участием или без участия супероксиддисмутазы	Цитотоксическое действие, образование $HO^\bullet$ в реакциях типа Фентоновской, локальное закисление среды, сосудосуживающее действие, ингибирование пролиферации лимфоцитов	Внутриклеточные каталаза и глутатионпероксидаза, церулоплазмин
Гидроксильный радикал $HO^\bullet$, 10^{-9} с, менее 10 нм	Разложение H_2O_2 ионами металлов переменной валентности (реакция Фентона), действие ионизирующего излучения на H_2O	Сильный окислитель, индуцирующий разрыв СН-связей; индуктор ПОЛ, вызывает повреждение белков, нуклеиновых кислот, оказывает сильное цитотоксическое, канцерогенное, мутагенное действие	Одно- и многоатомные спирты, аскорбиновая кислота, мочевая кислота, тиомочевина, урацил, диметилсульфоксид, мелатонин

Окончание табл. 3.1

1	2	3	4
Синглетный кислород $^1O_2$, 10^{-6} с, 0,3 мкм	Фотоиндуцированные реакции, сопутствующий продукт в реакциях с пероксидазами, образуется при спонтанной дисмутации O_2^-	Индукция ПОЛ; вызывает повреждение белков, нуклеиновых кислот, оказывает сильное цитотоксическое и мутагенное действие	Каротиноиды, азиды, токоферол, алкены, производные фурана, ароматические углеводороды, холестерин, гистидин, аскорбиновая и мочева кислота
Гипогалоиды OCl^- , OBr^- , OI^-	Реакция H_2O_2 с миелопероксидазой лейкоцитов, пероксидазой эозинофилов, лактопероксидазой, тиреопероксидазой	Индукция ПОЛ; вызывает инактивация ингибиторов протеаз, оказывает цитотоксическое действие	Церулоплазмин, мочева кислота, альбумин, аминокислоты (аланин, серин, валин, глицин)
Пероксидный радикал $RO_2^\bullet$, 10 с	Взаимодействие O_2 с органическими радикалами, реакции O_2^- , $^1O_2$, $HO^\bullet$, $RO^\bullet$ с ненасыщенными жирными кислотами липидов	Образование алкильных радикалов липидов и гидропероксидов	α -токоферол, убихинон, аскорбиновая и мочева кислоты
Алкоксильный радикал $RO^\bullet$, 10^{-6} с	Разложение органических пероксидов ионами металлов переменной валентности	Индукция ПОЛ; оказывает цитотоксическое и канцерогенное действие	α -токоферол, убихинон, аскорбиновая и мочева кислоты
Монооксид азота (II) $NO^\bullet$, стабилен	Работа NO-синтаз	Регуляция тонуса сосудов	пероксидазы, гемовые белки
Пероксинитрит $ONOO^-$, 10^{-9} с	Реакция взаимодействия $O_2^{\bullet-}$ с $NO^\bullet$	Индукция ПОЛ; оказывает сильное цитотоксическое, мутагенное и канцерогенное действие	

2. Методы анализа процессов образования АКМ

В отличие от обычных молекул свободные радикалы нельзя ни выделить, ни очистить. Поэтому обычно определяют устойчивые молекулярные продукты реакций, в которых участвовали радикалы. Прямым методом анализа радикалов является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), позволяющий идентифицировать радикалы путем анализа сверхтонкой структуры сигналов ЭПР. Однако в биологических системах ЭПР оказывается недостаточно чувствительным из-за крайне низкой стационарной концентрации радикалов в клетках и тканях [1, 3].

Образование свободных радикалов и АКМ можно определять косвенными методами, например, с использованием флуоресцентных зондов, методом хемилюминесценции (ХЛ) [1, 3]. Метод ХЛ обладает определенными преимуществами: весьма чувствителен при обнаружении именно высокореакционных радикалов, обычно не связан с изменением хода процессов в растворах, клетках или даже целых тканях, где регистрируется свечение. Методом ХЛ непосредственно определяется не концентрация радикалов, а скорость реакции, в которой они образуются.

В общем случае реакция, в которой образование радикалов ($R\cdot$) приводит к ХЛ, может быть представлена схемой:



где K_1 и K_2 – константы скоростей реакций образования $R\cdot$ и их рекомбинации с образованием продукта в возбужденном энергетическом состоянии P^* ; K_e – константа, характеризующая процесс люминесценции (при переходе продукта из возбужденного энергетического состояния P^* в основное P с излучением квантов света).

Интенсивность свечения пропорциональна скорости последней реакции:

$$I_{\text{ХЛ}} = K \cdot K_e \cdot [P^*],$$

где K – коэффициент, характеризующий чувствительность прибора к излучению с данным спектром и квантовым выходом. Вследствие высокой скорости реакций превращения радикалов $[R\cdot]$ в системе быстро устанавливается стационарное состояние, стадией, лимитирующей процесс, оказывается первая стадия – образование $[R\cdot]$. Таким образом, интенсивность ХЛ пропорциональна скорости образования радикалов.

Интенсивность собственной ХЛ при рекомбинации $[R\cdot]$ низка и для повышения чувствительности метода применяют усилители свечения («активаторы»), которые можно подразделить на 2 типа: химические и физические. Физические активаторы не вступают в химические реакции и не влияют на ход реакций, сопровождающихся свечением, но, тем не менее, многократно усиливают интенсивность хемилюминесценции. В основе их действия лежит физический процесс переноса энергии с молекулы продукта хемилюминесцентной реакции на активатор. К физическим активаторам можно отнести некоторые люминесцирующие соединения, применяемые при цепном окислении липидов [3]. В настоящее время еще не изучено до конца, какие именно соединения могут быть применены, и в лабораториях, занимающихся проведением данного вида исследований, ведутся работы по их поиску. Оказалось, что некоторые красители и комплексы редкоземельных элементов обладают способностью многократно усиливать интенсивность такой хемилюминесценции. Самыми эффективными активаторами оказались производные кумарина, которые усиливали реакцию хемилюминесценции в 1500 раз [3].

Химические активаторы (усилители) ХЛ – соединения, вступающие в химические реакции с АКМ или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы, находящиеся в возбужденном электронном состоянии и впоследствии излучающие свечение при переходе в основное состояние с высоким квантовым выходом. Широко используемые активаторы – люминол (3-аминофталевый гидразид), который испускает свет, переходя с возбужденного синглетного уровня (флуоресценция), и люцигенин (бис-N-метилакридиний), для которого имеет место фосфоресценция и, соответственно, меньший квантовый выход [3, 9]. Под действием АКМ происходит образование радикала люминола, который затем вступает в реакцию с $\cdot O_2^-$, образуя внутреннюю перекись (диоксид). Разложение диоксида приводит к образованию возбужденной молекулы 3-аминофталата. Переход 3-аминофталата в основное состояние сопровождается испусканием света.

Механизм реакций, ответственных за свечение люминола LH_2 , можно представить с помощью схемы [9].

Показано, что путь превращения гидропероксидного ключевого продукта до электронно-возбужденной аминфталевой кислоты один и тот же при действии многих оксидантов [9].

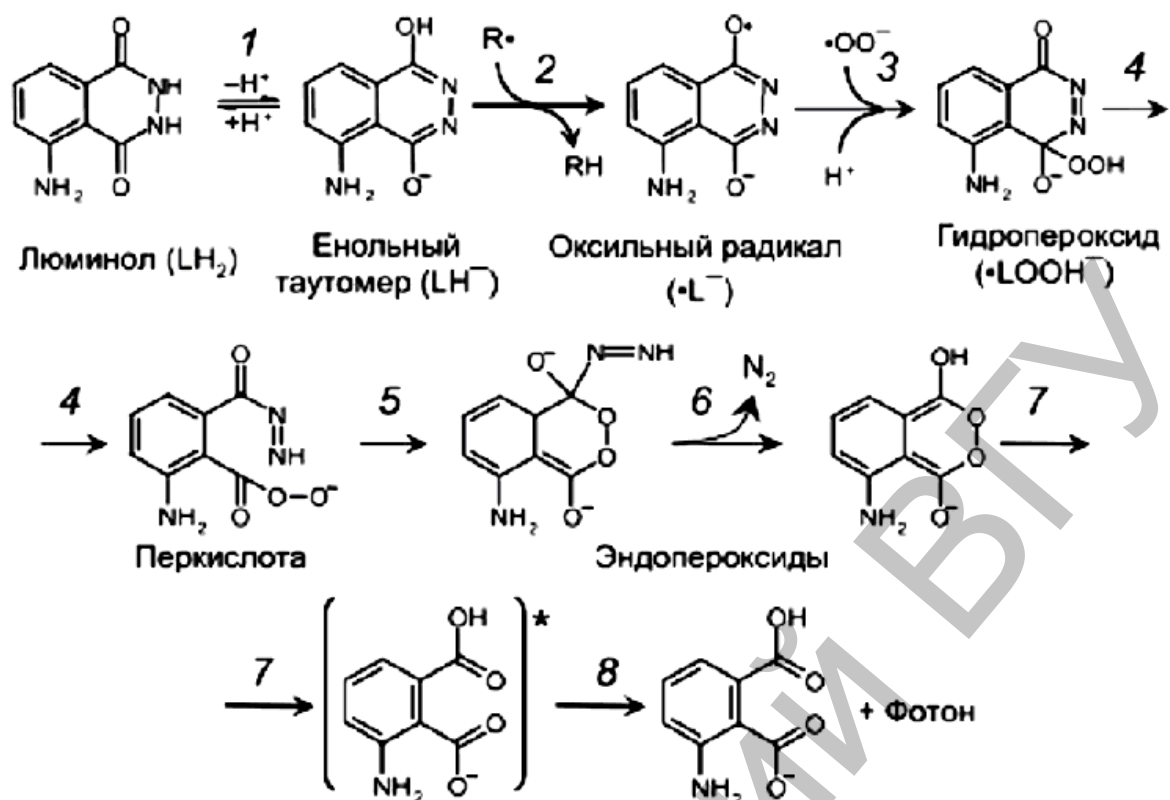
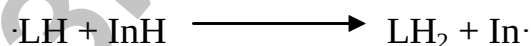


Рис. 3.1. Одноэлектронное окисление люминола.

Следует отметить, что образованный оксильный радикал люминола $\cdot\text{LH}$ может вступать в реакции, которые не приведут к ХЛ: взаимодействовать с другим радикалом люминола или с одноэлектронным окислителем $\text{R}^\bullet$, подвергаться дальнейшему окислению или взаимодействовать с молекулой антиоксиданта InH [1]:



Таким образом, люминол взаимодействует с АКМ с образованием 3-аминофталата в возбужденном энергетическом состоянии. Показано, что 3-аминофталат флуоресцирует в водных растворах в области 370–40 нм с максимумом 428–438 нм, максимальный квантовый выход около 0,02 фотона на молекулу люминола при $\text{pH} = 11$. Квантовый выход люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) значительно зависит от pH раствора, полярности растворителя, присутствия солей металлов. Например, в диметилсульфоксиде квантовый выход может достигать 0,1 фотона на молекулу люминола, тогда как в водном растворе максимально лишь 0,02 фотона на молекулу при щелочных pH . Обнаружено, что спектр ЛЗХЛ практически полностью совпадает со спектром фотолуминесценции (флуоресценции) 3-аминофталата и люминола.

3. Генерация АКМ фагоцитами крови

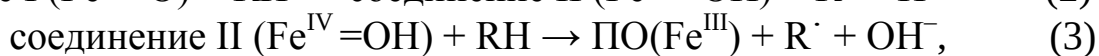
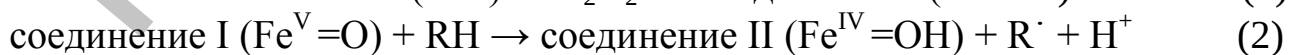
Измерение ЛЗХЛ клеток крови широко используется для изучения функционального состояния фагоцитарного звена иммунитета [3, 7–9].

Появление и взаимодействие чужеродного материала – патогенных микроорганизмов, частиц неорганических материалов (стекла, кристаллов, нерастворимых солей и т.д., латекса) – с фагоцитирующей клеткой запускает сложный каскад физиологических и метаболических процессов, начало которого – взаимодействие рецепторов на поверхности клетки с разного рода лигандами, включая иммунные комплексы [7–10]. *Основные системы, генерирующие АКМ в нейтрофилах (микрофагоцитах) и моноцитах/макрофагах, – это НАДФН-оксидаза, миелопероксидаза (МПО), NO-синтаза* [7, 8, 10].

НАДФН-оксидаза представляет собой многокомпонентный комплекс, отдельные ферменты которого в неактивированных клетках пространственно разделены и локализованы в цитозоле (p67-phox, p47-phox, p40-phox, Rac2), мембранах гранул и цитоплазматической мембране (Rap1A, p22-phox, gp91-phox) [4, 7]. При активации фагоцитов НАДФН-оксидазный комплекс подвергается сборке в плазматической мембране, активная НАДФН-оксидаза катализирует перенос электрона с НАДФН на O_2 с образованием O_2^- . Электрон-транспортирующим компонентом НАДФН-оксидазы является мембранный флавоцитохром b_{558} , включающий субъединицы gp91-phox и p22-phox, связанные с двумя гемовыми группами. Он осуществляет перенос электрона по схеме:

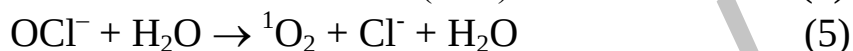


МПО – гемовый белок, локализована внутри азурофильных гранул и высвобождается при дегрануляции [4–7]. МПО катализирует «классические» пероксидазные реакции (1–3), а также образование гипохлорита в присутствии H_2O_2 . Пероксидазы (ПО) катализируют реакции окисления субстратов по следующей схеме:

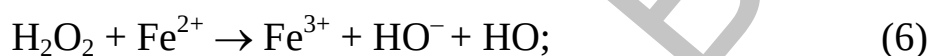


где RH и $R^\cdot$ – окисляемый субстрат и его радикал (например, LH_2 – люминол, $LH^\cdot$ – радикал люминола).

Соединение I является высокоактивным комплексом, проявляющим ферментативную активность. В случае МПО соединение I может взаимодействовать с ионами Cl^- с образованием гипохлорита и «регенерацией» фермента [3–5]:



Кроме того, в присутствии ионов металлов переменной валентности, например, железа, происходит образование радикалов гидроксила из перекиси водорода (реакция Фентона) и гипохлорида (реакция Осипова) [3–5]:



NO-синтаза катализирует образование NO, который в присутствии O_2^- превращается в пероксинитрит ONOO^- [8].

Возникновение ЛЗХЛ связано с образованием 3-аминофталата в возбужденном состоянии:



где АКМ – H_2O_2 , O_2^- , $\text{HO}\cdot$, OCl^- , ONOO^- и др.

На практике обычно регистрируют кинетические зависимости интенсивности ЛЗХЛ ($I=I(t)$) клеток в процессе действия активирующих агентов. При этом регистрируется интенсивность свечения не на одной из длин волн, а во всем спектральном диапазоне, в котором чувствителен ФЭУ хемилюминометра. За счет этого хемилюминометры обладают значительно более высокой чувствительностью, чем люминометры, в последних из которых при выделении определенных длин волн происходит значительная потеря интенсивности сигнала.

Количество образованных радикалов (АКМ) за определенный промежуток времени t будет пропорционален площади под кинетической кривой:

$$[\text{АКМ}] = \int_0^t I(t) dt$$

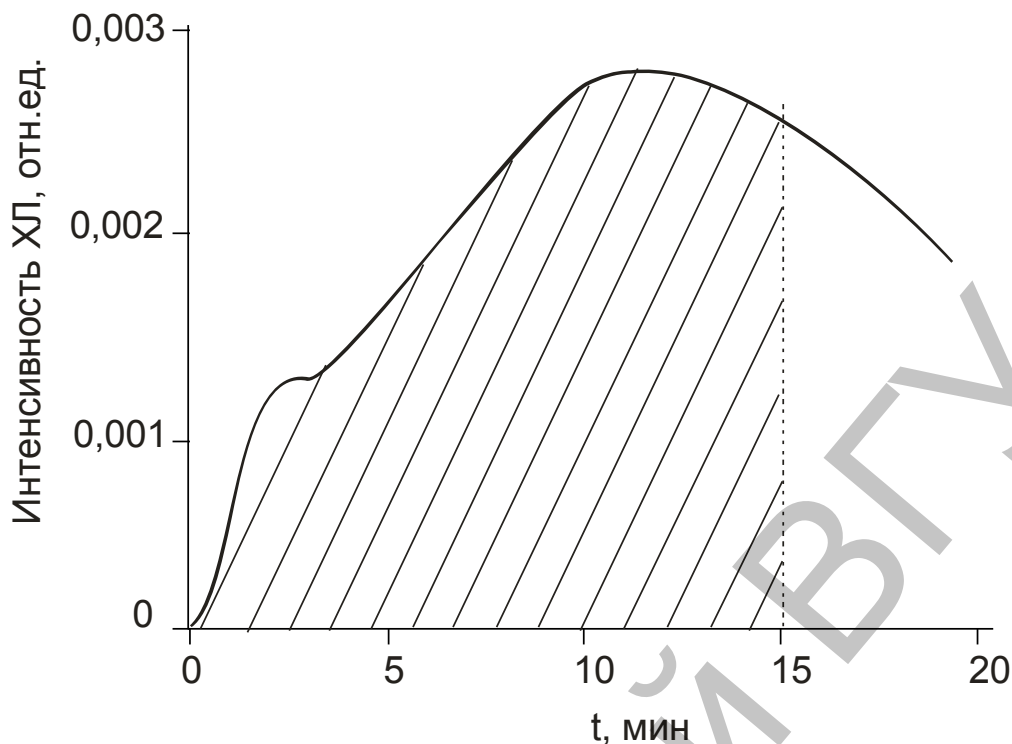


Рис. 3.2. Кинетическая зависимость интенсивности ХЛ $I(t)$ нейтрофилов в процессе их активации и площадь под кривой за время 15 мин.

Нейтрофилы активируются и генерируют АКМ как во внеклеточной среде при действии крупных агентов, которые не могут быть подвергнуты захвату внутрь клетки, так и внутри клеток в фаголизосомах при фагоцитозе микроорганизмов, клеточных обломков, частиц. В условиях *in vitro* можно исследовать эти виды активности клеток, изучая генерацию ЛЗХЛ при адгезии нейтрофилов на стеклянную подложку (внеклеточное образование АКМ) и при фагоцитозе частиц латекса (внутрифагосомальное формирование АКМ) [7, 8]. Разделение этих типов активации нейтрофилов является важным, поскольку внутрифагосомальная генерация АКМ отражает основную функцию нейтрофилов – способность фагоцитировать и разрушать патогенные микроорганизмы и тем самым защищать организм от инфекций. Генерация АКМ у наружной поверхности клеток может быть нежелательным процессом, поскольку при этом могут повреждаться окружающие ткани организма-хозяина, как это имеет место при атеросклеротическом поражении сосудов.

При действии антиокислителей или противовоспалительных агентов активность клеток и их способность генерировать АКМ может снижаться.

Эффективность ингибирующего действия можно оценить по снижению интенсивности ЛЗХЛ клеток и выразить в процентах:

$$E_i = \frac{[AKM]_0 - [AKM]_i}{[AKM]_0} \cdot 100\%,$$

где E_i – эффективность действия i -го вещества, $[AKM]_0$ – количество АКМ в отсутствие ингибиторов, $[AKM]_i$ – в присутствии i -го вещества.

Для сравнения эффективности различных антиоксидантов проводят анализ концентрационных зависимостей $E_i = E_i(C_i)$, где C_i – концентрация i -го вещества или степень разведения для сложных смесей.

4. Изменение активности нейтрофилов крови человека при взаимодействии с компонентами жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда в условиях *in vitro* [11]

Целью работы было изучить влияние нативного жидкого содержимого куколок (НЖСК) дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.), нормированного по содержанию свободных аминокислот 15 г/л, на процессы генерации активных кислородных метаболитов и секреторную дегрануляцию нейтрофилов крови человека при активации клеток в условиях *in vitro*.

Генерация нейтрофилами АКМ. Суспензию нейтрофилов ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) помещали в стеклянную кювету, добавляли НЖСК, люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) или люцигенин ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и исследовали параметры усиленной люминолом (Люм-) или люцигенином (Люц-) хемилюминесценции (ХЛ), обусловленной генерацией нейтрофилами АКМ при активации клеток в процессе адгезии к стеклу. Через 10 мин в образцы вносили синтетический хемотаксический трипептид fMet-Leu-Phe (fMLP – $7,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) затем спустя 5 мин добавляли латекс (50 мкл разбавленной 1:50 базовой суспензии латекса для определения ревматоидного фактора) и определяли параметры ХЛ, обусловленной образованием АКМ при действии fMLP и фагоцитозе клетками латекса. Кинетические зависимости интенсивности ХЛ активированных клеток регистрировали с помощью компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биохемилюминометр БХЛ-1 (Белгосуниверситет, РБ) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom («Новые аналитические системы», РБ). Интегральную интенсивность ХЛ клеток вычисляли как площадь под кинетической кривой, полученной за время измерения 10 мин при адгезии или за время 4 мин при действии латекса или fMLP. Ингибиторный эффект определяли в процентах.

Влияние НЖСК на реакции окисления, катализируемые миелопероксидазой нейтрофилов. Нейтрофилы ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) разрушали до-

бавлением 0,1% раствора Triton X-100. При этом миелопероксидаза (МПО) переходила в среду и становилась доступной для реакций, что позволяло исследовать влияние НЖСК на реакции, катализируемые МПО. В кювету хемиллюминометра помещали суспензию разрушенных нейтрофилов, НЖСК, люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л), H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и оценивали скорость окисления люминола пероксидом водорода, катализируемого МПО хемиллюминесцентным методом [11, 12]. Для этого регистрировали кинетические зависимости интенсивности ХЛ, а затем рассчитывали интегральную интенсивность ХЛ за 1,5 мин. Ингибиторный эффект определяли в %.

Секреторная дегрануляция азурофильных гранул нейтрофилов. Суспензии нейтрофилов ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) помещали в стеклянные пробирки, добавляли НЖСК, fMLP ($7,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) (там, где это указано) и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. Нейтрофилы при адгезии на стекло и действии fMLP активируются и секретируют МПО во внеклеточную среду [9]. По окончании инкубирования надосадочную жидкость собирали и центрифугировали в течение 7 мин при 400 g для осаждения неадгезировавших клеток. В полученных образцах внеклеточной жидкости определяли уровень активности МПО, секретированной клетками, по интенсивности ХЛ, индуцированной добавлением люминола ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Полученные значения выражали в % от общего уровня активности МПО в нейтрофилах.

Нейтрофилы формируют АКМ в процессе воспаления при активации под действием хемотаксических агентов (бактериальных пептидов, интерлейкина-8, лейкотриенов), при действии адгезионных молекул – лектинов, интегринов, иммуноглобулинов, при адгезии на эндотелий, фибронектин, а также непосредственно в ходе фагоцитоза микроорганизмов и частиц. Были выбраны модели, где в качестве активирующих воздействий использованы fMLP, частицы латекса, индуцирующие фагоцитарную активность нейтрофилов, и стеклянная подложка в качестве адгезионного субстрата.

На рис. 3.3 показаны кинетические зависимости интенсивности Люм-ХЛ нейтрофилов при адгезии клеток на поверхность стекла (1, 1'), при внесении fMLP (2, 2') и латекса (3, 3'). Возникающее свечение является следствием взаимодействия люминола с АКМ (O_2^- , H_2O_2 , $\text{OH}^\cdot$, $^1\text{O}_2$, OCl^- , ONOO^-), генерируемыми активируемыми нейтрофилами. Зависимости 1–3 были получены в отсутствие НЖСК, а кривые 1'–3' при добавлении в клеточную суспензию 2 мкл, разбавленного в 20 раз НЖСК, на 1 мл суспензии. Как видно из рис. 3.1, при добавлении НЖСК дубового шелкопря-

да происходит снижение выхода АКМ как в случае активации клеток в ходе адгезии, так и при воздействии fMLP и латекса.

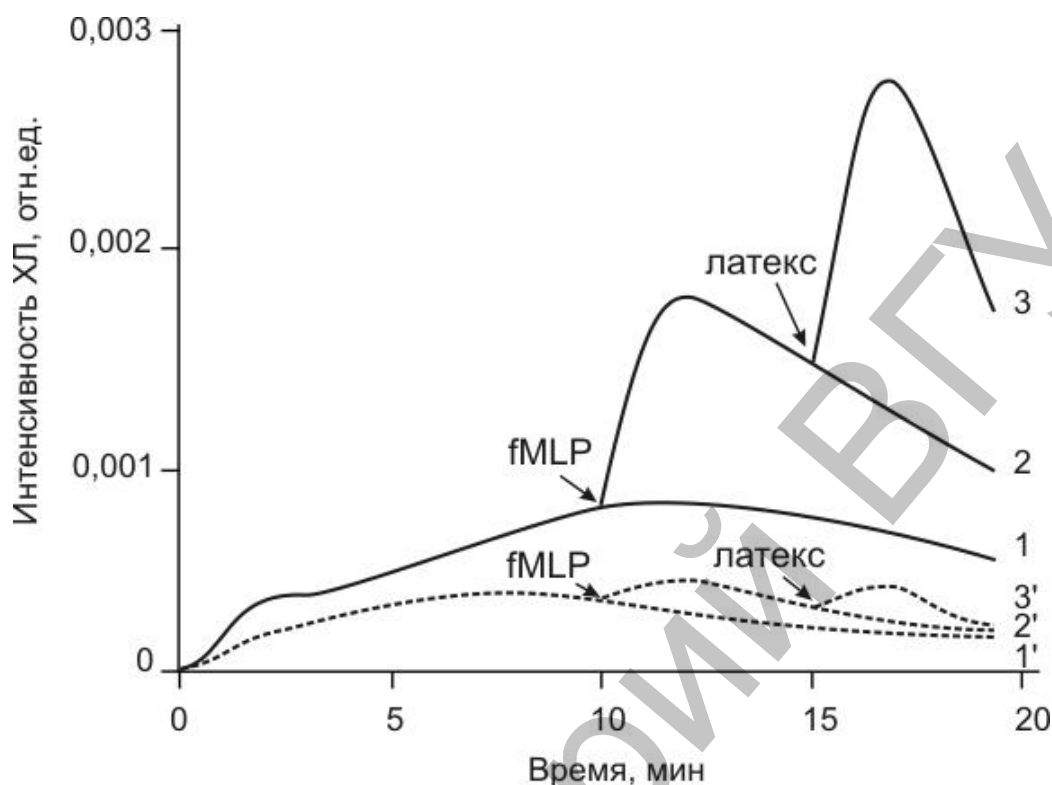


Рис. 3.3. Кинетические зависимости Люм-ХЛ нейтрофилов при адгезии клеток на поверхность стекла (1, 1'), при внесении fMLP (2, 2') и латекса (3, 3').

На рис. 3.4 приведены данные, характеризующие величину ингибиторного эффекта НЖСК в зависимости от количества вносимого препарата. Обнаружено, что ингибирующий эффект НЖСК в отношении генерации клетками АКМ, вызванной действием латекса и fMLP (рис. 3.4, кривые 2, 3), значительно выше, чем в отношении активации клеток в ходе адгезии на стекло (рис. 3.4, кривая 1). Выход АКМ, генерируемых при адгезии, снижается на 50% при количестве НЖСК в среде, соответствующем разбавлению в 500 раз, а при воздействии на нейтрофилы fMLP и латекса снижение выхода АКМ на 50% наблюдается при разбавлении НЖСК более, чем в 10^4 раз.

С целью уточнения мишеней действия НЖСК было изучено его влияние на Люц-ХЛ нейтрофилов. Установлено, что НЖСК дубового шелкопряда не оказывает значительного влияния на интенсивность Люц-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии, действии латекса и fMLP. Разница между Люм-ХЛ и Люц-ХЛ характеризует участие в генерации АКМ миелопероксидазы, поскольку люцигенин, в отличие от люминола, не окисляется МПО, не взаимодействует с ОСГ и другими продуктами МПО. Таким образом, полу-

ченные данные свидетельствуют об ингибирующем влиянии НЖСК на МПО-зависимую генерацию АКМ нейтрофилами.

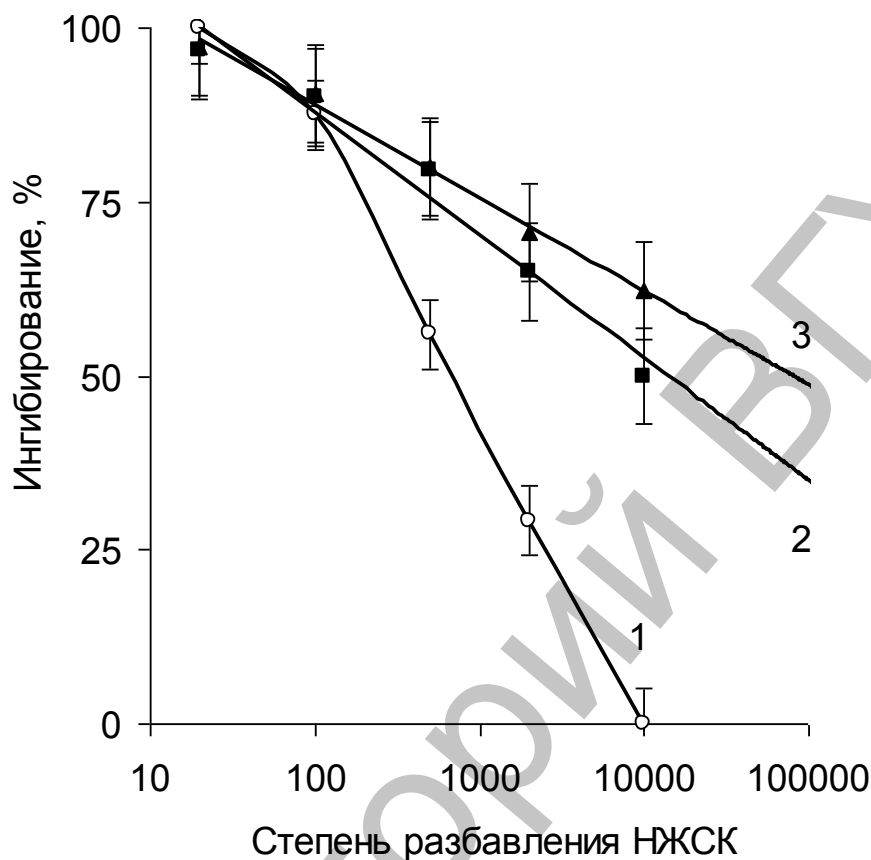


Рис. 3.4. Ингибирующий эффект НЖСК дубового шелкопряда на Люм-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии (1), действии fMLP (2) и латекса (3) в зависимости от степени разбавления НЖСК. Указана конечная степень разбавления препарата при его внесении в суспензию клеток.

На рис. 3.5 представлена зависимость, характеризующая влияние НЖСК на окисление люминола пероксидом водорода в присутствии МПО разрушенных нейтрофилов. Как и в случае цельных жизнеспособных нейтрофилов, при действии на фермент МПО разрушенных клеток препарат НЖСК также ингибировал способность МПО катализировать окисление люминола. Ингибирование на 50% наблюдается при добавлении НЖСК в количестве, соответствующем разбавлению более, чем в 10^4 раз. Следовательно, компоненты НЖСК могут напрямую влиять на МПО-зависимые реакции.

Как известно, МПО в покоящихся нейтрофилах локализована в азурофильных лизосомальных гранулах и вовлекается в процессы генерации АКМ только после высвобождения из гранул при активации клеток. МПО, секретированная из нейтрофилов во внеклеточное пространство, может приводить к окислительной модификации белков, липидов и прочих ве-

ществ на удалении от клетки, что обуславливает важность процесса секреторной дегрануляции. На рис. 3.6 показано влияние НЖСК на секрецию МПО из нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии на стекло и при действии fMLP. Клетки были проинкубированы в течение 1 ч при 37 °С в отсутствие или присутствии НЖСК, а затем проведена оценка высвобождения МПО во внеклеточную среду в процентах по отношению к полному содержанию МПО в нейтрофилах. Видно, что НЖСК тормозит секрецию МПО во внеклеточную среду и при активации клеток в процессе адгезии, и при действии fMLP. По-видимому, влияние НЖСК на процессы активации кислорода в нейтрофилах не ограничивается прямым взаимодействием НЖСК с МПО и ее продуктами, но и включает супрессивное действие на процессы активации нейтрофилов.

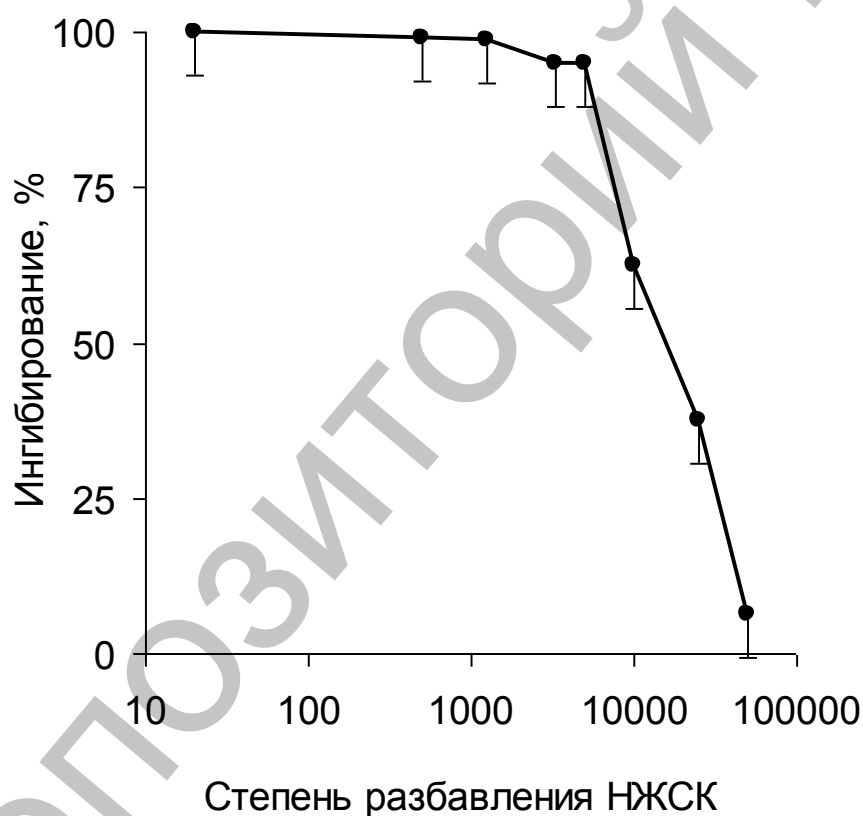


Рис. 3.5. Зависимость ингибирующего действия НЖСК на Люм-ХЛ в системе «люминол + H_2O_2 + МПО разрушенных нейтрофилов» от степени разбавления НЖСК. Указана конечная степень разбавления препарата при его внесении в суспензию.

Поскольку выход ферментов из клеток и инактивация клеток могут происходить в результате клеточной гибели, в работе изучено повреждение нейтрофилов при действии НЖСК по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ). ЛДГ является цитозольным ферментом и может оказываться во

внеклеточной среде только вследствие нарушения барьерной функции плазматической мембраны клетки. Проведенные исследования показали, что НЖСК в использованных концентрациях не приводит к усилению высвобождения из нейтрофилов ЛДГ и, следовательно, не вызывает разрушения нейтрофилов по механизму некроза.

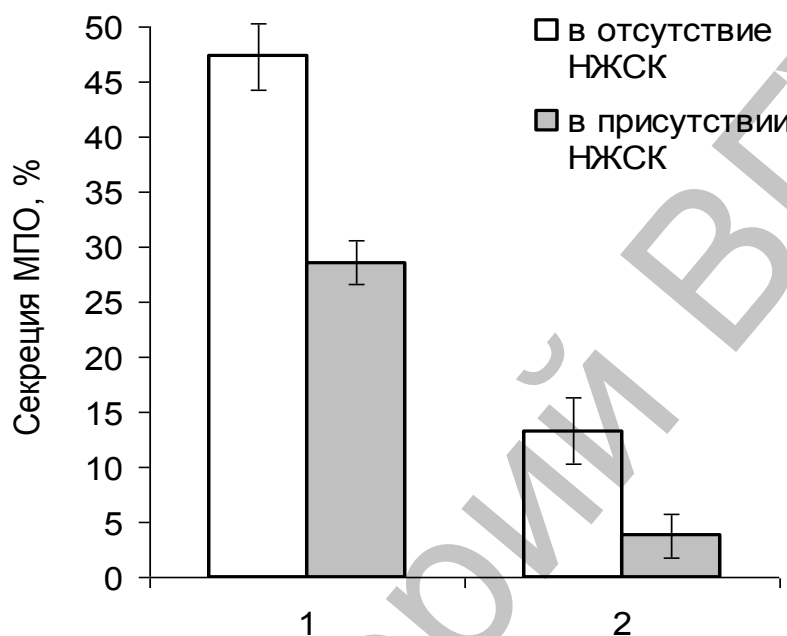


Рис. 3.6. Влияние НЖСК на секрецию МПО из нейтрофилов при активации клеток в процессе адгезии (1) и при действии fMLP (2).

Важные внутриклеточные ферменты, регулирующие процессы сборки НАДФН-оксидазных комплексов, дегрануляции нейтрофилов, а также гибели нейтрофилов по механизму апоптоза, являются фосфатидилинозитол-3-киназа (ФИ-3-К) и 5-липоксигеназа (5-ЛО). Была изучена зависимость действия НЖСК на генерацию нейтрофилами АКМ от ингибиторов 5-ЛО и ФИ-3-К. На рис. 3.7 показаны данные, отражающие ингибирующее действие НЖСК на Люм-ХЛ нейтрофилов в отсутствие и присутствии в среде МК-886 (блокатор активации 5-ЛО) и LY294002 (ингибитор ФИ-3-К) в случае активации клеток при адгезии и действии fMLP. Как видно, ингибирующий эффект НЖСК на генерацию АКМ при действии fMLP слабо зависит от МК-886 и LY294002. В то же время ингибирующее действие НЖСК на образование АКМ при активации нейтрофилов в процессе адгезии значительно снижается при блокировании 5-ЛО и ФИ-3-К. Такой результат подтверждает, что действие НЖСК не ограничивается лишь влиянием на активность МПО и включает изменение процессов внутриклеточной сигнализации.

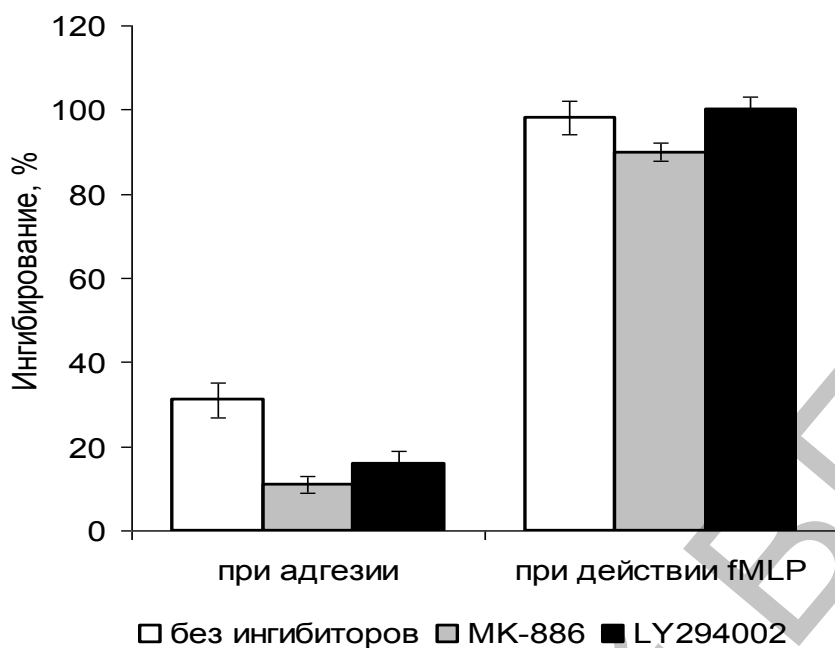


Рис. 3.7. Ингибирующий эффект НЖСК в отношении Люм-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в отсутствие и присутствии МК-886 ($2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и LY294002 ($1,7 \cdot 10^{-7}$ моль/л).

Итак, НЖСК дубового шелкопряда приводит к ингибированию процессов генерации нейтрофилами АКМ путем непосредственного ингибирования МПО-зависимых окислительных реакций и за счет снижения секреции из нейтрофилов МПО во внеклеточную среду. Ингибирующий эффект в отношении образования нейтрофилами АКМ при действии латекса и fMLP многократно превышает величину воздействия НЖСК на активацию нейтрофилами кислорода при адгезии. Действие НЖСК на нейтрофилы частично зависит от функционирования 5-ЛО и ФИ-3-К внутриклеточных сигнальных путей и не является результатом некроза клеток.

5. Изменение ПОЛ эритроцитов человека при взаимодействии с компонентами жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда в условиях *in vitro* [12]

Окислительные повреждения эритроцитов вызывали *tert*-бутил гидроперекисью (tBOOH – 100 ммольного раствора). Необходимое количество окислителя (1 и 2 ммоль/л) вносили в суспензию эритроцитов. Гемолимфу помещали в суспензию эритроцитов непосредственно перед внесением окислителя. Концентрацию образовавшихся стабильных продуктов пероксидного окисления мембранных липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), определяли спектрофотометрически по методу Stocks and Dormandy, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Внутриклеточную концентрацию восстановленного

глутатиона (GSH) определяли спектрофотометрически по методу Элмана. Использовали значение молярного коэффициента поглощения $\varepsilon_{412} = 1,36 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Использовали гемолимфу, предварительно разбавленную в 5 раз и стабилизированную фенилтиомочевинной.

Инкубация эритроцитов с tBOOH привела к образованию продуктов перекисного окисления мембранных липидов и окислению эритроцитарного глутатиона. Внесение предварительно разбавленной гемолимфы эффективно ингибировало окислительные процессы в эритроцитах, уровень образующихся продуктов ПОЛ уменьшался на 55% (рис. 3.8).

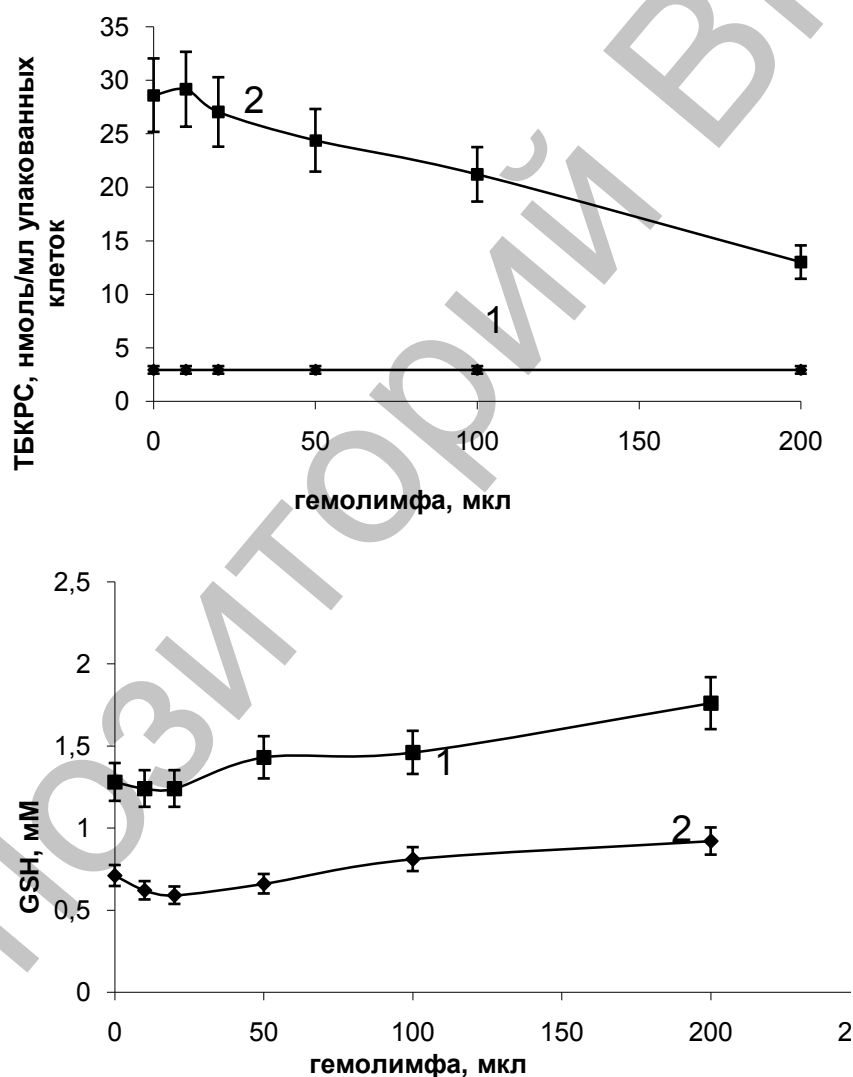


Рис. 3.8. Верхний график – эффект гемолимфы на процесс перекисного окисления липидов эритроцитов человека (1 – эритроциты инкубировали с гемолимфой в отсутствие tBOOH; 2 – эритроциты инкубировали с гемолимфой в присутствии tBOOH); нижний график – эффект гемолимфы на процесс окисления глутатиона в эритроцитах человека (1 – эритроциты инкубировали с гемолимфой в присутствии 1 mM tBOOH, 2 – эритроциты инкубировали с гемолимфой в присутствии 2 mM tBOOH).

Уровень восстановленного глутатиона в эритроцитах, подвергнутых действию окислителя (1 мМ tBOOH) в присутствии гемолимфы, был на 38% выше, нежели в отсутствие протектора. Еще более выраженным антиоксидантным эффектом обладала гемолимфа шелкопряда, непосредственно извлеченная из куколки. Гемолимфа более чем на 65% ингибировала процесс генерирования продуктов пероксидного окисления липидов в эритроцитах в присутствии 2 мМ tBOOH. Известно, что индуцируемое органическим пероксидом окислительное повреждение эритроцитов связано с генерацией алкоксильного и пероксильного радикалов в реакции окислителя с оксигемоглобином. Можно предположить, что компоненты гемолимфы непосредственно взаимодействуют с образующимися радикалами либо ингибируют процессы их образования.

6. Уникальность выявленного антиоксидантного эффекта

Для оценки уникальности выявленного антиоксидантного эффекта у гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда был произведен поиск аналогичной активности гемолимфы виноградных улиток (*Helix pomatia* L.). При вычислении 50% ингибирования образования активных форм кислорода показано, что гемолимфа куколок дубового шелкопряда эффективнее гемолимфы виноградных улиток в системе люминол + HOCl в 200 раз, люминол + миелопероксидаза хрена + H₂O₂ в 200 раз, генерации активных форм кислорода нейтрофилами при адгезии в 700 раз, генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии fMet-Leu-Phe в 300 раз и генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии латекса в 4000 раз. Следовательно, ингибирующее действие гемолимфы дубового шелкопряда наблюдается при степени ее разбавления на несколько порядков более высокой, чем гемолимфы виноградных улиток.

Антиоксидантный эффект может зависеть от количества и спектра свободных аминокислот после превращения гусеницы в куколку. Общее количество свободных аминокислот в жидком содержимом куколок китайского дубового шелкопряда составляет 14,6 г/л, в том числе обнаружены (M±m, ммоль/л) глутамин (19,07±1,886), аланин (18,33±2,601), глицин (17,15±0,907), серин (13,13±1,711), треонин (10,28±0,272), гистидин (10,26±0,367), лизин (8,659±0,586), валин (8,162±0,193), пролин (5,586±0,409), лейцин (4,763±0,133), аспарагиновая кислота (4,700±0,561), изолейцин (4,337±0,145), тирозин (2,530±0,230), цитрулин (2,152±0,141), фенилаланин (1,043±0,070), таурин (0,976±0,112), глутаминовая кислота (0,899±0,081), метионин (0,672±0,083), бета-аланин (0,511±0,029), этаноламин (0,227±0,016), орнитин (0,044±0,004) [13].

Лабораторная работа № 1

Выделение нейтрофильных лейкоцитов из крови

Оборудование и материалы: центрифуга; световой микроскоп; камера Горяева; центрифужные пробирки; микропипетки автоматические.

Реактивы: раствор NaCl 0,15 М; раствор декстрана-500 7% в 0,15 М NaCl; раствор фиколл-урографина (плотность 1,077 г/см³); сбалансированный солевой буферный раствор Эрла (ССБР Эрла) pH 7,4; гепаринизированная кровь.

Разделение клеток в градиенте плотности фиколл-урографина основано на различиях плотностей клеток крови: гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) имеют плотность более 1,077 г/см³ и при седиментации оседают на дно пробирки, а мононуклеары (моноциты, лимфоциты) – менее 1,077 г/см³ и остаются на поверхности слоя фиколла-урографина. Наибольшую плотность имеют эритроциты, и они оседают наиболее быстро из всех клеток крови. Кроме того, используется то, что эритроциты наименее устойчивы к гипотоническим условиям и быстрее подвергаются лизису, чем лейкоциты.

Ход выделения:

1. Гепаринизированную кровь перемешивают с раствором декстрана-500 из расчета 5:1 и инкубируют 1 ч при комнатной температуре для седиментации эритроцитов. Получаем нижний темный слой с эритроцитами и верхний желтый слой плазмы с лейкоцитами.

2. В центрифужные пробирки наливают по 2,5 мл фиколл-урографина, не касаясь верхних стенок пробирок.

3. На слой фиколл-урографина осторожно наслаивают собранную плазму с лейкоцитами. Плазму необходимо собирать и наслаивать аккуратно, не допуская перемешивания слоев. Далее пробирки центрифугируют в течение 30 мин при 1500 об/мин.

4. Полученные фракции гранулоцитов (в осадке) и мононуклеаров (в тонком слое на поверхности фиколл-урографина) собирают в различные пробирки.

5. К фракции гранулоцитов добавляют 1 мл холодной дистиллированной воды и активно перемешивают в течение 20 с для лизиса остатка эритроцитов.

6. Фракции гранулоцитов и мононуклеаров дважды отмывают в 0,15 М NaCl, центрифугируя в течение 8 мин при 1500 об/мин. Затем ресуспензируют в ССБР Эрла.

7. С помощью камеры Горяева и светового микроскопа определяют количество клеток в единице объема.

В норме фракция гранулоцитов крови человека представлена преимущественно нейтрофилами (около 96%).

Лабораторная работа № 2

Исследование антиокислительных свойств гемолимфы куколок дубового шелкопряда или гемолимфы виноградных улиток

Оборудование и материалы: биохемилюминометр с термостатом; кювета кварцевая; микропипетки автоматические; пробирки.

Реактивы: суспензия нейтрофилов; сбалансированный солевой буферный раствор Эрла (ССБР Эрла) pH 7,4; гемолимфа куколок дубового шелкопряда; гемолимфа виноградных улиток; суспензия частиц латекса; раствор люминола 1 ммольный раствор; CaCl_2 0,1 ммольный раствор.

Ход исследования:

Регистрация ЛЗХЛ нейтрофилов осуществляется при 37 °С, во всех образцах содержание клеток должно быть одинаково (1–2 млн/мл).

1. Готовят различные разведения гемолимфы шелкопряда и улиток.
2. В кварцевую кювету вносят суспензию нейтрофилов, 50 мкмоль люминола, 1 ммоль CaCl_2 , доводят до общего объема пробы 1 мл ССБР Эрла.
3. С помощью биохемилюминометра регистрируют кинетическую зависимость интенсивности ЛЗХЛ нейтрофилов, активируемых в ходе адгезии к стеклу, в течение 10 мин.
4. В ту же кювету далее в темноте добавляют 30 мкл суспензии латекса и регистрируют кинетические зависимости интенсивности ЛЗХЛ клеток в ходе фагоцитоза латекса на 10 мин.
5. Затем повторяют пункты 2–3, добавляя в кювету различные количества растворов гемолимфы. При этом для каждого разведения гемолимфы пробы в кювете готовят заново, предварительно хорошо вымыв кювету!
6. Для получения статистически достоверных результатов все эксперименты следует повторить не менее 3-х раз.
7. С использованием программного обеспечения определяют площади по кинетическими кривыми (рис. 3.9).
8. Рассчитывают эффективность ингибиторного действия гемолимфы шелкопряда и улиток для различных степеней разбавления образцов.
9. Полученные зависимости $E_i = E_i(C_i)$ изображают графически на одном рисунке.

Контрольные вопросы

1. Какие вещества относятся к группе активных кислородных метаболитов?
2. Каковы пути возникновения и утилизации свободных радикалов и АКМ?
3. В чем заключается патофизиологическая значимость образования АКМ и свободных радикалов в развитии патологий?
4. Какие методы позволяют изучать образование свободных радикалов?
5. В чем заключается метод хемилюминесценции?
6. Что такое физические и химические усилители ХЛ?
7. Какие типы АКМ можно регистрировать с использованием люминола?
8. В каком спектральном диапазоне флуоресцирует люминол?
9. В каких случаях клетки иммунной системы могут приводить к значительному образованию АКМ?

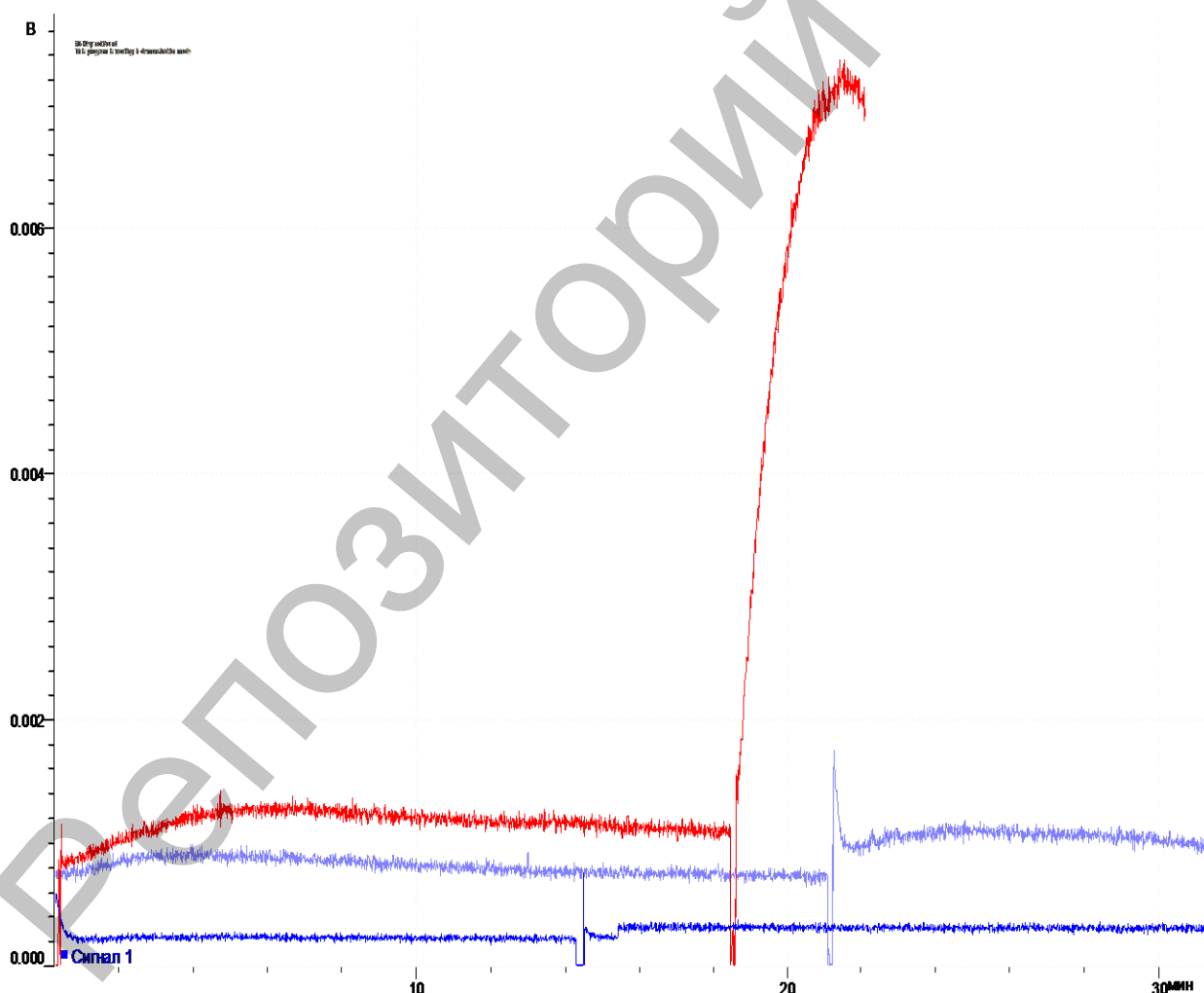


Рис. 3.9. Пример кинетической зависимости интенсивности люминольной ХЛ нейтрофилов при их адгезии и последующем добавлении fMLP (примерно через 20 мин после начала адгезии клеток) в отсутствие гемолимфы (верхняя кривая) и в присутствии гемолимфы (средняя кривая) и контроль — среда Эрла (нижняя кривая). В присутствии гемолимфы подавляется ЛЗХЛ на введение fMLP.

10. Какие основные ферменты ответственны за генерацию АКМ в фагоцитах крови млекопитающих? Какие типы АКМ генерируют эти ферменты?

11. Каковы реакции, обуславливающие возникновение ЛЗХЛ в системе, содержащей МПО?

12. Каким образом методом ЛЗХЛ можно исследовать противовоспалительные и антиокислительные свойства веществ?

13. Выберите из перечня свободных аминокислот гемолимфы аминокислоты, обладающие антиоксидантным действием.

Работа выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований (грант БР09-154).

Литература

1. Менщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Менщикова [и др.]. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
2. Менщикова, Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Менщикова, Н.К. Зенков // Успехи совр. биол. – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 442–455.
3. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
4. Novo, E. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis / E. Novo., M. Parolo // Fibrogenesis Tissue Repair. – 2008. – Vol. 1. – P. 5–63.
5. Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe / S.J. Klebanoff // J. Leukoc. Biol. – 2005. – Vol. 77. – P. 598–625.
6. Podrez, E.A. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis / E.A. Podrez, H.M. Abu-Soud, S.L. Hazen // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28. – P. 1717.
7. Kavalenka, A.I. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro / A.I. Kavalenka, G.N. Semenkova, S.N. Cherenkevich // Cell Tissue Biology. – 2007. – Vol. 1, № 6. – P. 551–559.
8. Starodubtseva, M.N. Effects of peroxyxynitrite on morphology and functions of neutrophils / M.N. Starodubtseva [et. al.] // «Handbook of free radicals: formation, types and effects» ed. by D. Kozyrev and V. Slutsky. Series: Cell Biology Research Progress. – Nova Science Publishers, 2010. – 642 p.

9. Рощупкин, Д.И. Усиленная люминолом хемилюминесценция полиморфоядерных лейкоцитов кролика: природа оксидантов, непосредственно вызывающих окисление люминола / Д.И. Рощупкин, Н.С. Белакина, М.А. Мурина // Биофизика. – 2006. – Т. 51, вып. 1. – С. 99–107.
10. Зайчик, А.Ш. Общая патофизиология (с основами иммунопатологии) / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. – СПб., 2005. – 656 с.
11. Коваленко, Е.И. Изменение активности нейтрофилов крови человека при взаимодействии с компонентами жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда в условиях *in vitro* / Е.И. Коваленко [и др.] // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 3. – С. 21–26.
12. Чиркин, А.А. Антиоксидантные эффекты гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда при моделировании окислительного стресса в клетках человека / А.А. Чиркин [и др.] // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта. – 2009. – № 3(53). – С. 152–158.
13. Чиркин, А.А. Белковый и аминокислотный состав куколок китайского дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта. – 2007. – № 1(43). – С. 143–149.

Г Л А В А 4. БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕТАБОЛИЗМА ЙОДА В ОРГАНИЗМЕ

В 1846 году впервые выдвинута гипотеза о роли недостаточности йода в развитии зоба. Научное подтверждение она получила лишь в 1896 году, когда немецкий биохимик Бауман установил присутствие йода в ткани щитовидной железы (ЩЖ) и успешно использовал экстракты ЩЖ различных животных для лечения зоба и кретинизма у человека. Неустраняемая экологическая недостаточность йода в почве и воде является причиной йоддефицитных заболеваний (ЙДЗ). По данным Всемирной организации здравоохранения, болезни, обусловленные нехваткой йода, – самые распространенные заболевания неинфекционной природы на нашей планете.

1. Биологическая роль йода

Молекулярный йод – химически активное вещество, сильный окислитель. Поэтому в чистом виде в природе он не существует, однако входит в состав многих природных органических соединений, присутствует в неорганических солях. В сутки человеку требуется около 100–200 мкг йода. Йод поступает в организм в составе химических соединений: органических и неорганических. В желудочно-кишечном тракте носитель йода отщепляется, и микроэлемент в виде йодид-аниона доставляется кровотоком в ЩЖ. Йод является *незаменимым субстратом* для синтеза тиреоидных гормонов, которые выполняют важнейшую роль в регуляции функции важнейших метаболических систем организма. Гормоны ЩЖ ускоряют обменные процессы, влияют на обмен белков, липидов, углеводов; повышают насыщение тканей кислородом; влияют на физическое и психическое развитие человека; усиливают окислительные процессы, контролируют выработку тепла; регулируют функции центральной нервной системы; влияют на деятельность сердечно-сосудистой системы и печени; повышают сопротивление организма к неблагоприятным факторам окружающей среды. Таким образом, свою биологическую роль в организме йод выполняет, в первую очередь, как составная часть гормонов щитовидной железы, участвуя в регуляции всех важнейших метаболических функций.

2. Периферический метаболизм йода. Дейодиназы: распределение, характеристика, функционирование

Хорошо известно, что тироксин (3, 5, 3', 5'-тетрайодтиронин) T_4 – основной гормон, продуцируемый ЩЖ, не проявляет биологической актив-

ности, его можно рассматривать как прогормон или плазменное депо тиреоидных гормонов, – что, по-видимому, имеет важную физиологическую роль. Основную функцию в активации T_4 играет семейство селеноцистеин-содержащих оксидоредуктаз, названных йодтиронин-дейодиназами. Идентифицированы 3 типа этих ферментов, активность которых во многом определяет реализацию гормонального эффекта тиреоидных гормонов. Локализация дейодиназ и их активность являются тканеспецифичными. 5'-дейодиназа I типа (ДI) локализована в печени, почках, ЩЖ, легких, глазах. 5'-дейодиназа II типа (ДII) определяется, в основном, в головном мозге, гипофизе, миокарде, скелетных мышцах, бурой жировой ткани; 5'-дейодиназа III типа (ДIII) – в печени, коже, мозге, плаценте. ДI и ДII катализируют образование T_3 из T_4 , ДIII дейодирует внутреннее тирозильное кольцо в положении 3 и 5, инактивируя T_3 и T_4 , и играет важную роль в регуляции биодоступности тиреоидных гормонов в течение эмбрионального развития.

Избыток йодида снижает активности дейодиназы I типа в периферических тканях, что изменяет тканевую доступность тиреоидных гормонов. Содержание линии мышей Balb/c на высокойодной диете не только значительно снижает активность печеночной дейодиназы I типа, но и концентрацию селена, – микроэлемента, необходимого для проявления активности данного фермента. Важнейшим регулятором активности дейодиназ являются глюкокортикоидные гормоны, которые наиболее значительно влияют на активность ДII в мозге. Даже мягкий кратковременный стресс индуцирует повышение активности 5'-йодтирониновой дейодиназы типа 2 в мозге, что сопровождается повышением концентрации T_3 более чем на 300%. В клетках опухоли гипофиза At-20 была идентифицирована ДII, активность которой и экспрессия мРНК стимулировались глюкокортикоидами и КРГ. Снижение уровня тиреоидных гормонов в крови и уровня мРНК ТРГ при голодании сопровождается повышением активности ДII и мРНК ДII. Исследование механизмов активации ДII во время голодания позволило установить, что снижение уровня лептина играет перmissive роль при активации глюкокортикоид-индуцированной регуляции ДII. У взрослых крыс глюкокортикоиды индуцируют снижение в печени активности ДI. В исследованиях, выполненных на культуре гепатоцитов, показан противоположный эффект: глюкокортикоиды повышают активность ДI и экспрессию мРНК ДI. В NRK 52E-клетках почек дексаметазон повышает активность и экспрессию мРНК ДI.

3. Механизмы поглощения йода. Натрий-йодидный симпортер. Пендрин

Поглощение и транспорт йода клетками щитовидной железы.

Способность тиреоидных фолликулярных клеток аккумулировать йод впервые была обнаружена в 1915 году. В настоящее время установлено, что транспорт йода осуществляется против его электрохимического и концентрационного градиентов из интерстициального пространства, куда он поступает путем диффузии из крови. Специфический переносчик йода в тироцитах натрий-йодидный симпортер (NIS) был идентифицирован в 1996 году; Dai G. с соавторами клонировали крысиный NIS, используя экспрессию кДНК в ооцитах *Xenopus laevis*. В том же году был клонирован NIS человека. Его функция связана с функционированием Na/K-АТФазы.

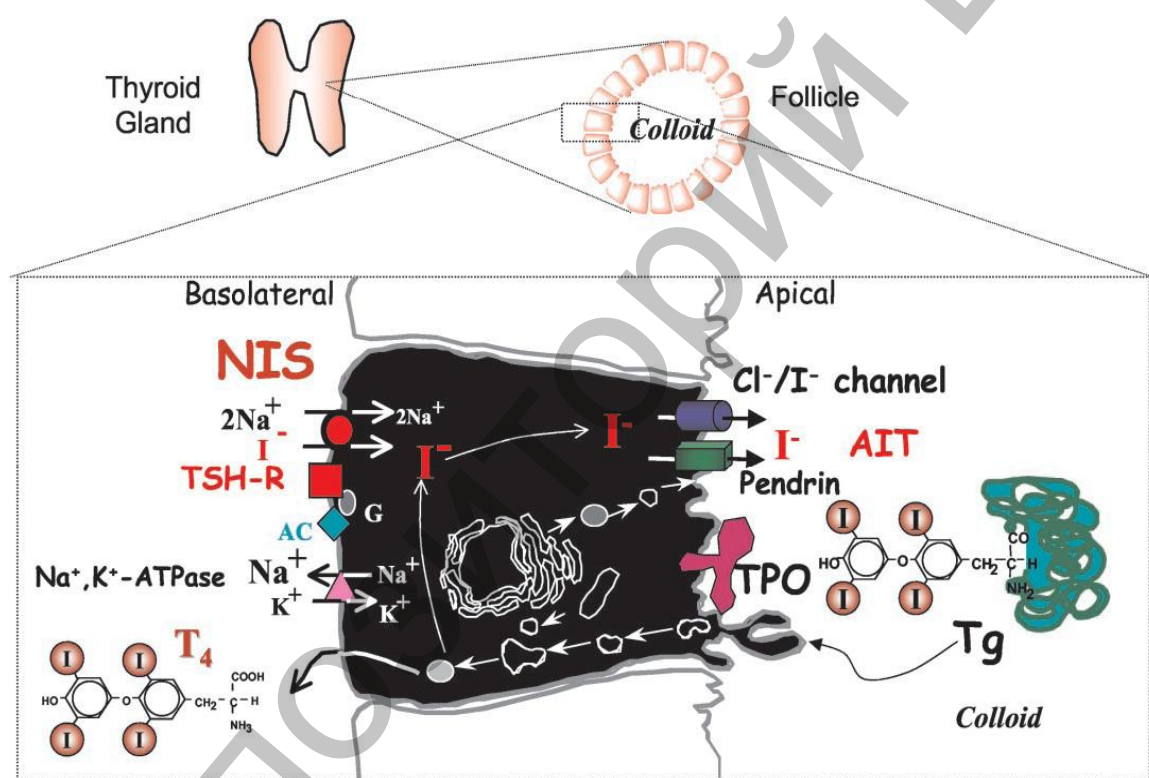


Рис. 4.1. Схема метаболизма йода в щитовидной железе. [The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance / Orsolya D.N. [et. al.] // Endocrine Reviews. – 2003. – Vol. 24, № 1. – P. 48–77].

Структурная и функциональная характеристика Na/I симпортера. NIS – гликопротеин, состоящий из 618 аминокислот. Это трансмембранный белок, пронизывающий липидный бислой, состоящий предположительно из 13 сегментов и локализованный на базолатеральной мембране тироцитов. Установлено, что несколько аминокислотных остатков в 9 сегменте, содержащих гидроксильную группу, необходимы для нормального

функционирования NIS. Роль углеводного компонента в молекуле NIS не установлена; ни частичное, ни полное нарушение гликозилирования белка не влияет на его стабильность и функциональную активность. Спонтанные мутации, затрагивающие замену треонина на пролин в позиции 354, являются причиной врожденного недостатка транспорта Γ у ряда больных гипотиреозом (рис. 4.1).

Механизмы транспорта йода NIS включают следующие взаимодействия: на внешней стороне базальной мембраны NIS связывает два иона Na^+ и один Γ , вследствие конформационного изменения молекулы связанные ионы Γ перемещаются внутрь клетки (рис. 4.2). В цитоплазматическом компартменте происходит отделение 2Na^+ и Γ , и освободившийся переносчик изменяет конформацию, перемещая сайт связывания снова на внешнюю поверхность мембраны.

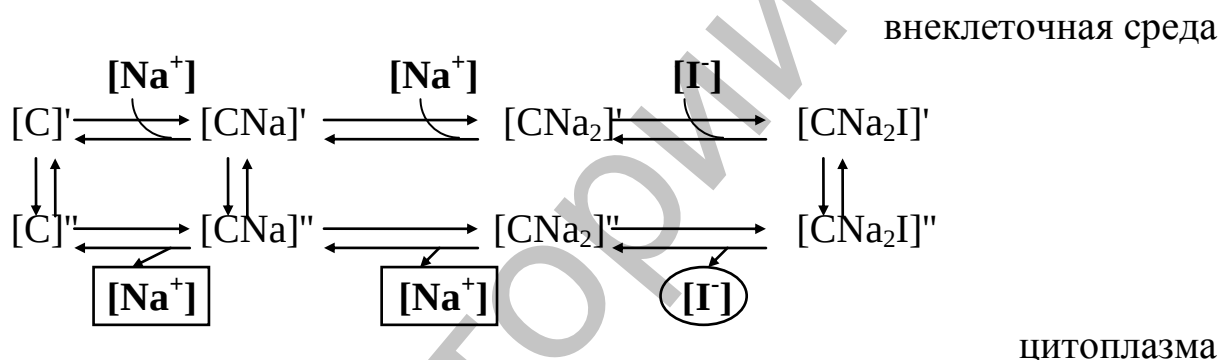


Рис. 4.2. Схематическая модель транспорта Γ в клетку посредством Na/Γ симпортера (C – carrier (англ.) – переносчик) [Thyroid Na^+/Γ symporter: mechanism, stoichiometry, and specificity. / S. Eskandari, D.D. Loo, G. Dai [et. al.] // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – P. 27230–27238].

Кроме ионов йода, NIS способен перемещать через базальную мембрану и ряд других ионов, которые могут конкурентно ингибировать транспорт йода. Порядок сродства ионов для NIS окончательно не установлен, обсуждаются 2 варианта: $\text{ClO}_4^- > \text{ReO}_4^- > \text{I}^- \geq \text{SCN}^- > \text{ClO}_3^- > \text{Br}^-$. Остается дискуссионным вопрос о способности Na/Γ симпортера транспортировать ионы перхлората. NIS, как и другие белки активного транспорта, приводится в действие за счет энергии, запасенной в ионных градиентах, а не путем прямого гидролиза АТФ. Na/K -АТФаза, поддерживая градиент концентрации натрия, косвенным путем контролирует транспорт йода. NIS не является специфичным тиреоидным белком; известно, что йод поглощается также клетками слизистой желудка, слюнными и молочными железами, хороидным сплетением и цилиарным телом глаза и также опосредован NIS.

Регуляция поглощения йода клетками щитовидной железы. Основным регулятором функции ЩЖ, в частности поглощения йода тироцитами, является тиреотропный гормон (ТТГ), который контролирует экспрессию NIS. Активация синтеза NIS отмечалась в ЩЖ крыс с повышенным уровнем ТТГ после введения пропилтиоурацила, а также в результате недостаточного поступления йода с кормом. Тиреотропный гормон стимулирует также активность Na/K-АТФазы в ЩЖ. Показано, что воздействие ТТГ (10 mU/мл) в течение 6 часов в два раза увеличивало содержание мРНК, кодирующей α -1 субъединицу этого белка.

Кроме ТТГ на активность NIS оказывает регуляторное влияние промежуточный продукт синтеза тиреоидных гормонов – тиреоглобулин. Накопление тиреоглобулина (ТГ) около апикальной мембраны тироцитов приводит к снижению поглощения йода. Негативное действие фолликулярного ТГ на активность NIS проявляется в подавлении экспрессии его гена на транскрипционном уровне и направлено против стимулирующего действия ТТГ. Еще одним важным фактором регуляции поглощения I⁻ в ЩЖ (т.е. активности NIS) является сам йод. Избыточная концентрация I⁻ ингибирует экспрессию мРНК тиреопероксидазы и Na/I симпортера в ЩЖ собак. В условиях избыточного поступления йода снижается уровень мРНК NIS и самого белка.

Кроме основных регуляторов на поглощение йода оказывает влияние и ряд других веществ. Хорионический гонадотропин человека стимулирует захват йодида и активность аденилатциклазы в культуре тироцитов. Эстрадиол стимулирует рост клеток ЩЖ, но блокирует ТТГ-индуцируемую экспрессию NIS, что позволяет предположить возможность влияния этого фактора на распределение зоба в зависимости от пола, поскольку известно, что зоб чаще возникает у женщин, чем у мужчин. Цитокины также угнетают поглощение йода. Показано, что IL-1 β и IL-6 снижают ТТГ-стимулируемую экспрессию мРНК NIS в культуре клеток ЩЖ. IL-6 не влияет на функциональную активность NIS, тогда как IL-1 β снижает поглощение йода. Фактор некроза опухолей α и IL-1 α снижают уровень мРНК NIS на 70% и 40%, а его функциональную активность – на 20%.

Транспорт йода из тироцитов в фолликулярное пространство. Йод не накапливается в тироцитах. Показано существование апикальных каналов для йода, отвечающих за выход его ионов из клетки в коллоид. Эти каналы регулируются ТТГ, имеют высокую проницаемость и специфичность для ионов йода с K_m 70 мкмоль. Кроме этих каналов обнаружен еще один переносчик йода – трансмембранный белок пендрин, локализо-

ванный в апикальной мембране тироцитов и отвечающий за транспорт йода в фолликулярное пространство. Его активность не регулируется ТТГ и в отличие от основных белков, участвующих в синтезе тиреоидных гормонов (ТПО, ТГ, рецепторы к ТТГ и NIS), он стимулируется коллоидным тиреоглобулином.

4. Окисление и органификация йода. Тиреопероксидаза. Тиреооксидоредуктаза. Ферментативное и неферментативное окисление йодида

Окисление и органификация йода. Следующим этапом синтеза тиреоидных гормонов является окисление поступившего в тироцит йода и включение его в тирозильное кольцо тиреоглобулина. Йодирование ТГ происходит на поверхности раздела клетка–коллоид, примыкающего к апикальной мембране. Ключевым ферментом этого процесса является специфичный для клеток ЩЖ белок – тиреопероксидаза.

Структурная и функциональная характеристика тиреопероксидазы. ТПО – мембраносвязанный, гликозилированный гемопротейн. Установлены структура генов и аминокислотная последовательность ТПО человека, свиньи и крысы. Синтез белка происходит в эндоплазматическом ретикулуме, там же идет структурирование белка. Данные о внутриклеточной локализации ТПО свидетельствуют о том, что ТПО локализована в ЭР и пренуклеарной мембране, и лишь незначительная часть (1,5–2%) находится на апикальной поверхности тироцита. Важную роль в формировании пространственной структуры ТПО играет гликозилирование молекулы, нарушение которого снижает содержание ТПО в апикальной мембране, но не влияет на ее активность.

ТПО – интегральный белок апикальной мембраны тироцитов, содержащий большой внецитоплазматический домен, ориентированный в фолликулярное пространство. Домен содержит пять сайтов N-гликозилирования (Asn129, Asn307, Asn342, Asn369, Asn478), однако пятый сайт не несет углеводной цепи. Долгое время оставался дискуссионным вопрос о природе простетической группы ТПО. Вначале предполагали, что простетической группой фермента может быть протопорфирин IX, содержащий атом железа. Затем А. Rawitch в 1979 году продемонстрировал значительную разницу между пирролом гемохроматогена ТПО и пероксидазы хрена, что, по его мнению, свидетельствовало о том, что гем ТПО не является железопротопорфирином IX. Имеются данные, что ковалентному присоединению гема к ТПО способствует H_2O_2 .

Идентифицированы несколько изоформ ТПО человека (ТПО-2, ТПО-занелли, ТПО-4 и ТПО-5). Аминокислотная цепочка ТПО-2 короче на 57 аминокислотных остатков. Кроме этого, в молекуле отсутствует один из сайтов гликозилирования, в результате эта изоформа имеет особую конформационную структуру, что приводит к ее быстрой деградации в эндоплазматическом ретикулуме. Е. Zanelli с сотрудниками в 1990 году описали еще одну форму ТПО человека, которая состоит из 929 аминокислотных остатков. Однако, физиологическое значение изоформ ТПО до настоящего времени не выяснено.

Синтез тиреоидных гормонов осуществляется в фолликулярном пространстве. ТПО катализирует окисление йода и реакцию сочетания йодтирозинов. В первую очередь ТПО реагирует с H_2O_2 , образуя так называемый *комплекс I*. Затем происходит окисление йодида в реакции двухэлектронного переноса с образованием фермент-связанного катиона йода $(\text{E})\text{I}^+$. Хотя природа этого крайне реактивного и, следовательно, короткоживущего соединения не может быть исследована, существует несколько спорных сведений об образовании атома лиганда (EOI, ESI, ENI). Природа йодирующего агента в настоящее время не установлена, наряду с образованием йодиния рассматривается участие в йодировании тирозильных остатков молекулярного йода, гипойодата, йодата и др. (рис. 4.3).

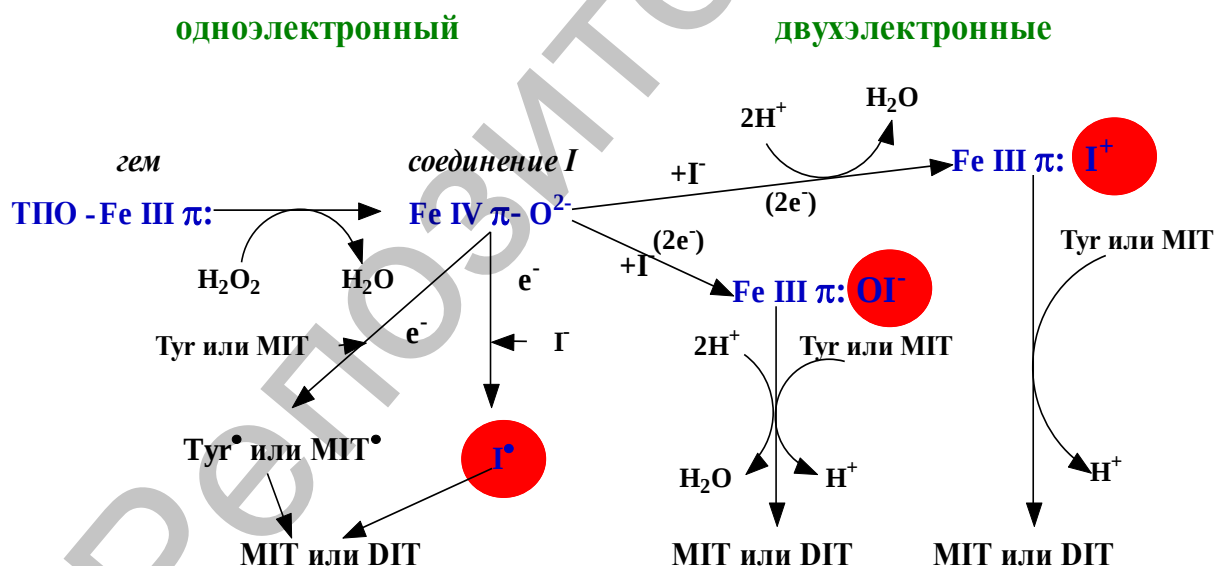


Рис. 4.3. Механизмы окисления йодида тиреопероксидазой.

Возможные активные формы йода: I^+ (йодиний), I_2 (молекулярный йод), $\text{I}^\bullet$ (свободный радикальный йод), IO^- (гипойодат), H_2IO^+ (протонированный гипойодат), IO_3^- (йодат).

Две молекулы йодированных тирозинов вступают в реакцию конденсации. В ходе этой реакции отщепляется боковая цепочка дегидроаланина от молекулы дийодтирозина, образующей наружное кольцо. При этом образуется T_4 . Если конденсируются монойодтирозин с дийодтирозином, образуется T_3 . Существуют две точки зрения на динамику реакции конденсации. Одна из них постулирует, что йодтирозины конденсируются в йодтиронины, будучи присоединенными к тиреоглобулину (внутримолекулярное соединение). Другая постулирует, что молекула дийодтирозина, которая образует наружное кольцо, сначала отщепляется от ТГ и затем вступает в реакцию конденсации (межмолекулярное соединение). Реакция сочетания, так же, как и окисления йода, катализируется активной формой ТПО (комплексом I).

Регуляция активности тиреопероксидазы. В 2002 г. Х. De Deken с сотрудниками показали, что ТТГ увеличивает уровень мРНК и ферментативную активность ТПО первичной культуры клеток ЩЖ. Каталитическая активность ТПО зависит от концентрации йода, тиреоглобулина и H_2O_2 как субстратов ферментативной реакции. Высокие концентрации H_2O_2 и йода оказывают ингибирующее действие на активность ТПО. Ингибирующий эффект H_2O_2 – следствие концентрационно-зависимой, двойной роли I^- и H_2O_2 в каталитической йодирующей системе. Иодид и H_2O_2 , в дополнение к их функции непосредственных субстратов ТПО, могут действовать как альтернативный «акцептор йодида» и поэтому конкурировать с тирозином, независимо от того, находится ли это соединение в форме фермент-связанного катиона йода или в эквивалентном окисленном виде (IOH , ICl , I_2). Ингибирующее действие избытка H_2O_2 объясняют образованием инактивированного пероксидазного комплекса. H_2O_2 в концентрации 0,1 ммоль/л более чем на 40% ингибирует активность ТПО (рис. 4.4).

Кроме ТТГ и субстратов катализируемой ТПО реакции, на активность фермента оказывают влияние и другие соединения. Трансформирующий фактор роста ингибирует экспрессию ТПО, интерферон- γ , интерлейкин-1 α и -1 β подавляют стимулирующий эффект ТТГ на экспрессию мРНК ТПО. Вопрос о том, какую роль играют цитокины в патофизиологии ЩЖ, до настоящего времени остается дискуссионным.

Ингибирующий и модифицирующий эффекты на активность ТПО оказывают альдегидные продукты ПОЛ (рис. 4.5, 4.6), что является причиной инактивации ТПО в условиях развития окислительного стресса в ЩЖ. Изменение кинетики ферментативного окисления йодида ТПО (рис. 4.5), характеризующееся появлением лаг-периода (который при концентрации

МДА в среде 0,5 ммоль/л составляет 60 с), – следствие модификации фермента.

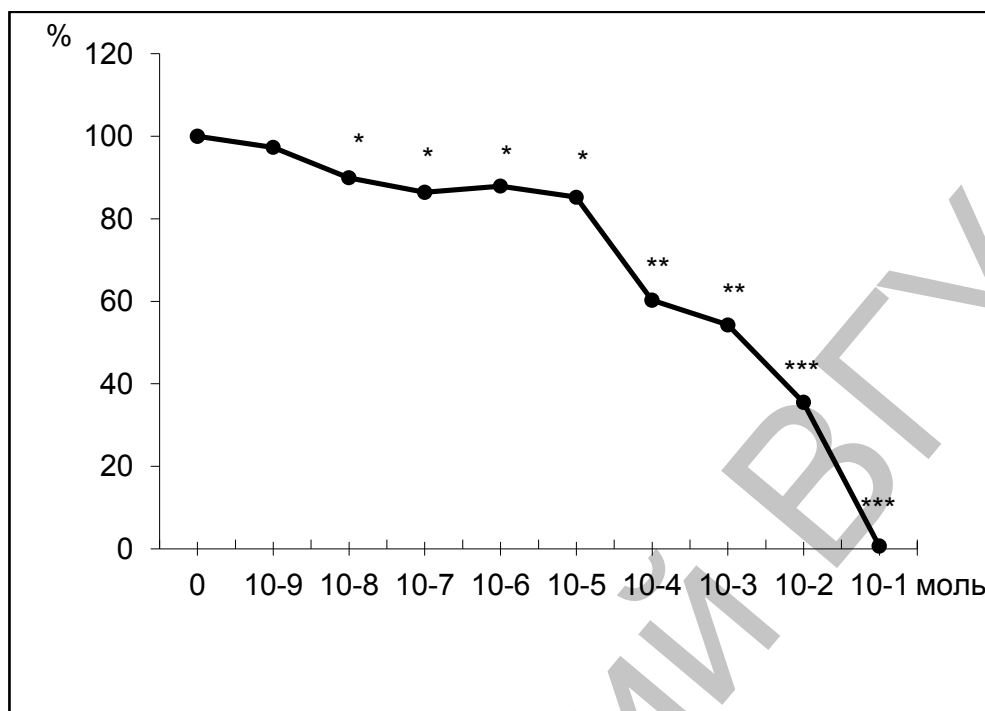


Рис. 4.4. Активность ТПО микросомальной фракции ЩЖ крыс в зависимости от концентрации H_2O_2 в среде.

По оси ординат – активность ТПО (% от исходной),
по оси абсцисс – концентрация H_2O_2 ; время инкубации 10 мин.

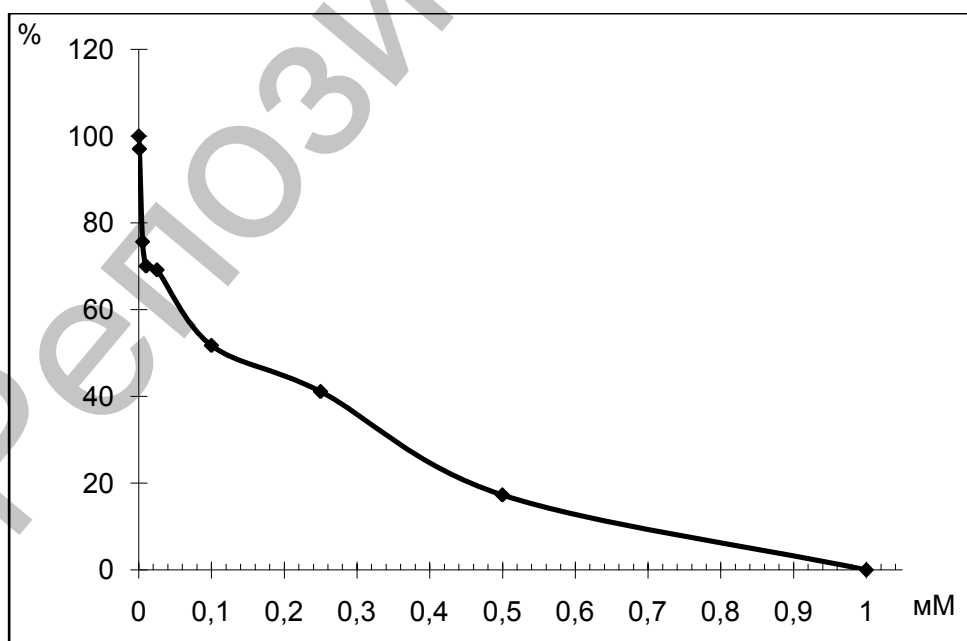


Рис. 4.5. Влияние малонового диальдегида на активность ТПО микросомальной фракции ЩЖ крыс. По оси ординат – активность ТПО в процентах от исходной активности, по оси абсцисс – концентрация малонового диальдегида в среде (ммоль/л).

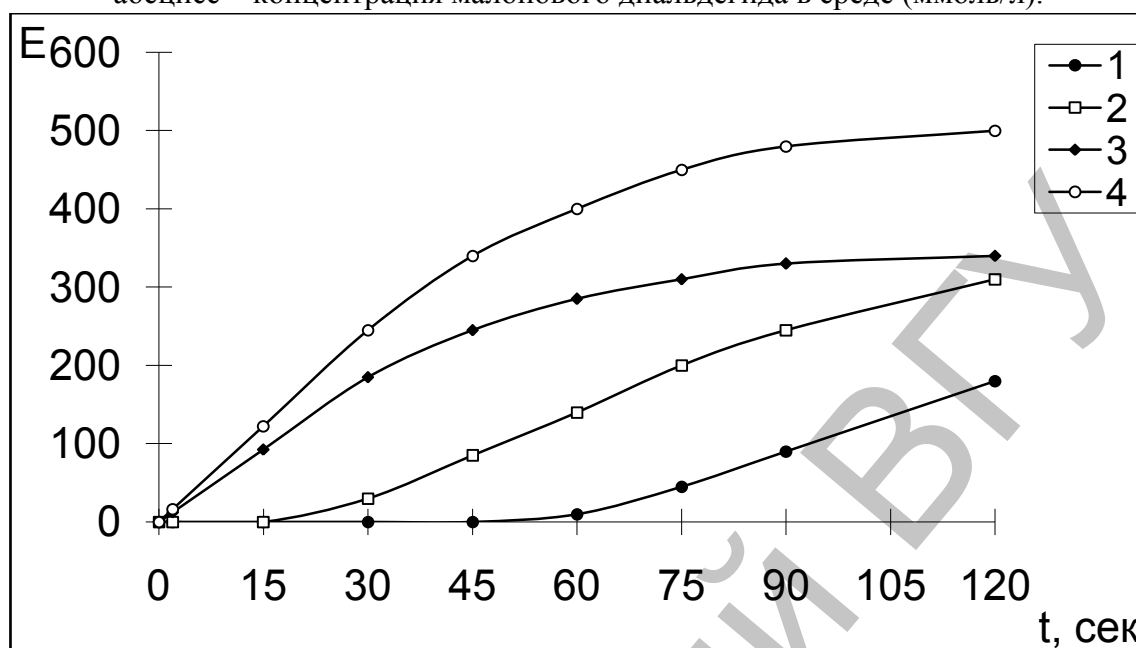


Рис. 4.6. Изменение скорости окисления йода ТПО микросомальной фракции ЩЖ в зависимости от концентрации МДА.

По оси ординат – оптическая плотность; по оси абсцисс – время реакции (секунды). Концентрация МДА в среде: 1 – 0,5 ммоль/л; 2 – 0,25 ммоль/л; 3 – 0,025 ммоль/л; 4 – контроль.

Ингибирующее влияние на активность ТПО оказывают некоторые изофлавоноиды, аминокислоты, содержащие атом серы (цистеин и метионин), или ароматическое кольцо (тирозин, триптофан, гистидин, фенилаланин). В этом случае возможно конкурентное ингибирование аминокислот с нормальным субстратом ТПО – тирозиновыми остатками молекулы ТГ за сайт связывания. При дефиците железа в организме активность ТПО снижается на 33–56%. Антитиреоидные лекарственные вещества – тионамиды (карбимазол и его активные метаболиты метимазол и пропилтиоурацил) инактивируют ТПО по принципу конкурентного ингибирования.

Система синтеза пероксида водорода в тироцитах. Пероксид водорода – необходимый акцептор электронов в катализируемых ТПО реакциях. В присутствии достаточного количества йода образование H_2O_2 является лимитирующим этапом в синтезе тиреоидных гормонов; угнетение синтеза H_2O_2 нарушает органификацию йода в тироцитах. Система образования H_2O_2 локализована на апикальной мембране клеток ЩЖ и не обнаруживается на базальной поверхности или внутри тироцита. H_2O_2 образуется в количестве $0,5\text{--}1,0 \text{ нмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг ДНК}^{-1}$ (базальный уровень). В конце 1980-х годов был охарактеризован фермент, синтезирующий H_2O_2

в тироцитах. Это НАДФН-оксидоредуктаза, называемая также тиреооксидазой. И только в начале XXI века были клонированы ДНК, кодирующие белок ТОх крысы, свиньи и человека. Было показано, что полипептидные цепочки человеческой и свиной ТОх состоят из 1210 и 1207 аминокислотных остатков соответственно. Фермент представляет собой гликозилированный флавопротеин, для нормального функционирования которого необходимо присутствие ионов кальция. Недостаточное поступление Ca^{2+} резко снижает скорость образования H_2O_2 .

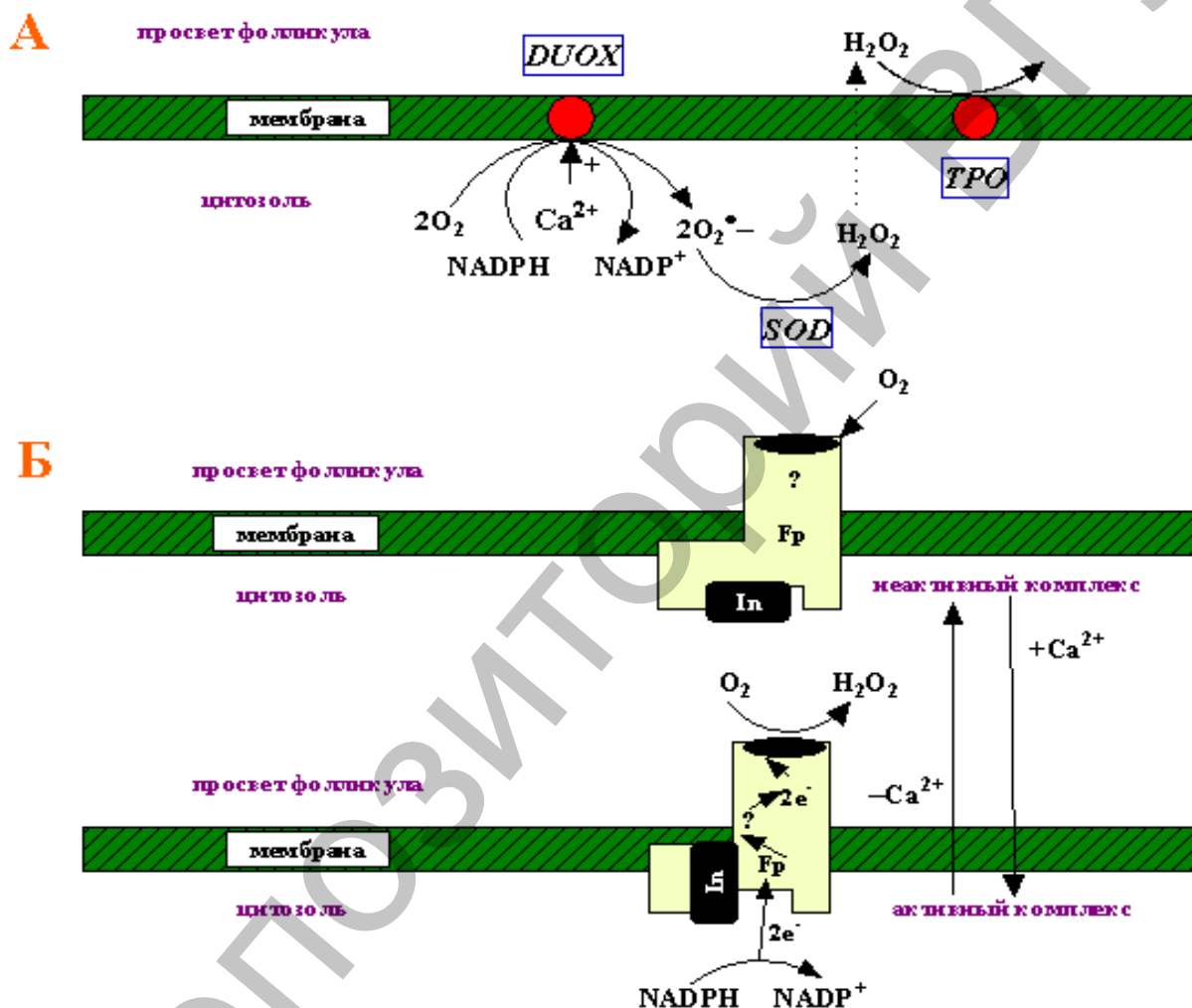


Рис. 4.7. Механизмы синтеза H_2O_2 в тироцитах 1 (А) и 2 (Б). [7].

Существуют две модели образования H_2O_2 : **(1)** На апикальной мембране тироцита ТОх взаимодействует с НАДФН, ионами кальция и O_2 , вызывая высвобождение супероксид-аниона $\text{O}_2^{\bullet-}$ в цитозоль. Затем в реакции, катализируемой супероксиддисмутазой, $\text{O}_2^{\bullet-}$ присоединяет два протона с образованием H_2O_2 . Пероксид водорода пересекает апикальную мембрану тироцита и становится доступным ТОх в просвете фолликула. Однако впо-

следствии Y. Nakamura и сотрудники показали, что СОД не влияет на активность образования H_2O_2 в плазматических мембранах ЩЖ, следовательно, реакция протекает без супероксид-аниона. Была предложена альтернативная схема синтеза H_2O_2 . (2). Согласно этой модели ТОх, связанная с апикальной мембраной, представляет собой комплексный флавопротеин, который активируется в присутствии ионов кальция. Активация сопровождается окислением НАДФН на цитозольной стороне мембраны, сопряженным переносом электронов на люминальную сторону мембраны к конечному акцептору – кислороду. В результате происходит генерация H_2O_2 сразу в просвете фолликула (рис. 4.7).

Как и в случае других тиреоидспецифичных белков, активность ТОх и экспрессия мРНК этого белка положительно регулируются ТТГ. ТОх свиньи необратимо ингибируется йодидом и 2-йодогексадеканалем. Исследования, проведенные *in vivo*, также показали, что тиреооксидаза человека ингибируется веществами, содержащими йод. С другой стороны, было показано, что в ЩЖ овец, свиней и коров и в меньшей степени собак йодид оказывает стимулирующее действие на образование H_2O_2 .

Двойной контроль образования H_2O_2 йодом имеет физиологическое значение, обеспечивая более эффективное окисление йода при поступлении в ЩЖ при его дефиците, и позволяет избежать избыточного окисления йода и синтеза тиреоидных гормонов, когда он в избытке.

В 2003 году A.F. Ferreira и сотрудники показали, что антитиреоидные лекарственные вещества (пропилтиоурацил и метимазол) оказывают подавляющее действие и на образование H_2O_2 , снижая активность ТОх.

5. Йодсодержащие белки. Тиреоглобулин. Окислительная модификация белков – йодирование

Тиреоглобулин (ТГ) является важнейшим белком щитовидной железы и служит матрицей для синтеза тиреоидных гормонов, а также для их депонирования и дозированного высвобождения. ТГ составляет 75–80% всего белка, содержащегося в ЩЖ млекопитающих. Это гликопротеин с молекулярной массой около 660 кДа и коэффициентом седиментации 19S. В состав одной молекулы входят две мономерные полипептидные цепи. Имеются полные данные о первичной структуре человеческого и бычьего ТГ. Неполная аминокислотная последовательность ТГ установлена для крысы, козы, овцы и кролика. Анализ аминокислотной последовательности показал высокоорганизованную структуру молекулы ТГ, содержащую три типа повторяющихся доменов. Домен первого типа содержит около 60 аминокислотных остатков и повторяется 10 раз между 1–1200 остатками

в ТГ человека. Домен второго типа короче (14–17 аминокислотных остатков) и повторяется 3 раза в позиции 1436–1483. Домен третьего типа включает в себя два подтипа а и б, повторяющихся 5 раз между 1583–2170 остатками. Наличие трех типов внутренней гомологии, вероятно, позволяет жестко фиксировать трехмерную структуру молекулы.

Биосинтез тиреоглобулина – сложный процесс, и может быть разделен на три стадии: 1) синтез белка, 2) гликозилирование, 3) йодирование. Синтез белка осуществляется в эндоплазматическом ретикулуме, где непосредственно после трансляции образовавшаяся молекула ТГ связывается с шаперонами. Из этого комплекса образуются мономеры, а затем в аппарате Гольджи формируются гомодимеры. При изучении путей секреции ТГ с использованием монослойной культуры тироцитов показано, что около 90% ТГ секретируется через апикальную поверхность клетки, а 10% – через базальную. Это может объяснить постоянное присутствие небольшого количества ТГ в крови. Вновь синтезированный белок отличается по свойствам от зрелого ТГ, он имеет меньший коэффициент седиментации (17S). После синтеза молекула ТГ проходит огромную посттрансляционную модификацию: гликозилирование, сульфатирование и фосфорилирование. Первый этап N-гликозилирования происходит в ЭР, тогда как дальнейшее включение углеводородных остатков происходит в аппарате Гольджи. ТГ – высокогликозилированный белок, содержащий около 10% углеводов. Углеводная часть состоит из 5–8 единиц производных маннозы (А единицы) и 13–22 сложных единиц (В единицы). Олигосахариды ТГ хорошо изучены (табл. 4.1).

Таблица 4.1 – Состав углеводов тиреоглобулина

Углевод	Человек	Свинья	Буйвол	Кит	Цыпленок
Галактоза	1,16	1,16	1,25	1,33	0,82
Манноза	3,61	2,61	3,43	2,11	3,90
Фукоза	0,46	0,37	0,39	0,39	0,28
Глюкозамин	3,06	2,94	2,27	2,36	3,00
Сиаловая кислота	–	НО	1,45	НО	НО

Примечание: НО – не определяли; «–» – не присутствует.

В дополнение к N-связанным углеводным частям, ТГ человека содержит две О-связанные олигосахаридные цепи: муцинового и сульфатглюкозаминогликанового типа. Гликозилирование ТГ обеспечивает «узнавание» белка в субклеточных и внеклеточных компартментах, содействует

гормоногенезу, обеспечивает взаимодействие с шаперонами и мембранными рецепторами.

Содержание йода в тиреоглобулине составляет от 0,1 до 1%. Йодирование тирозиновых остатков тиреоглобулина осуществляется в коллоиде, непосредственно около апикальной мембраны тироцита, в результате чего образуются монойодтирозин (МЙТ) и дийодтирозин (ДЙТ). Распределение МЙТ, ДЙТ, T_3 и T_4 в тиреоглобулине у разных видов представлено в табл. 4.2. Гликозилирование и йодирование играют важную роль в иммуногенности тиреоглобулина.

Таблица 4.2 – Сравнение состава йодированных продуктов у различных видов (остатков/моль)

	Человек	Свинья	Буйвол	Верблюд	Кит	Цыпленок
МЙТ	6,45	11,06	9,02	4,94	7,30	11,00
ДЙТ	4,78	15,23	2,09	3,16	7,00	24,60
T_3	0,29	1,02	НО	0,54	0,41	–
T_4	2,28	5,35	15,20	1,29	2,50	3,55

Примечание: НО – не определяли; «–» – не присутствует.

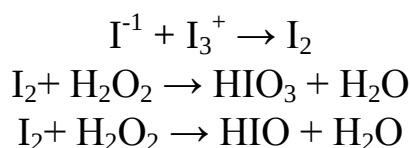
Для секреции тиреоидных гормонов йодированный ТГ поступает из коллоидного пространства в клетку. У крыс тироциты захватывают тиреоглобулин путем фагоцитоза (макропиноцитоз). После введения ТТГ гипопфизэктомированным крысам на апикальной мембране тироцитов образуются псевдоподии, которые захватывают коллоид, формируя так называемые «коллоидные капли». Однако у большинства видов, включая человека, поглощение ТГ происходит исключительно микропиноцитозом (эндоцитоз). Эндоцитоз может быть неспецифическим и рецепторопосредованным. В случае неспецифического эндоцитоза на апикальной плазматической мембране образуются маленькие везикулы, которые, впячиваясь, формируют внутриклеточные пузырьки, сливающиеся впоследствии с эндосомами, а затем с лизосомами, где происходит быстрая первичная фрагментация ТГ под действием катепсина В и цистеиновой протеиназы ИЖ. Далее лизосомальные ферменты (протеазы, эндопептидазы, гликозидгидролазы, фосфатазы) гидролизуют ТГ с образованием свободных T_3 и T_4 . Снижение активности лизосомальных гидролаз приводит к формированию вакуолей, содержащих негидролизованые молекулы ТГ, что сопровождается подавлением накопления йода тироцитами. Деградация ТГ ферментами лизосом регулируется тиреотропином и опосредуется цАМФ. При рецепторо-опосредованном эндоцитозе на клеточной поверхности происходит специфическое, высокоаффинное связывание субстрата с рецепто-

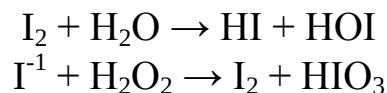
ром. Показано существование нескольких типов высокоаффинных рецепторов к ТГ на апикальной мембране. Принимая во внимание высокую концентрацию ТГ в коллоиде, маловероятно, что высокоаффинные рецепторы на апикальной мембране тироцита требуются для связывания и поглощения ТГ. Предполагается, что асиалогликопротеиновые рецепторы связывают незрелые формы ТГ, которые затем рециркулируют обратно в коллоид. Эта же функция приписывается пока еще не идентифицированным N-ацетилглюкозаминовым рецепторам. Другой высокоаффинный рецептор – мегалин (gp330) опосредует захват ТГ тироцитами, особенно при интенсивной стимуляции ТТГ. Тиреоглобулин, связанный с мегалином, не гидролизуется в лизосомах, а в интактном виде путем транцитоза поступает из коллоида в кровоток. С рецептором-мегалином преимущественно связывается ТГ с низким содержанием T_3 и T_4 . В 2003 году S. Lisi с сотрудниками высказывается предположение, что таким образом предотвращается избыточное поступление тиреоидных гормонов в кровь. Существуют и низкоаффинные рецепторы, но их роль в захвате ТГ до конца не установлена.

Регуляция синтеза тиреоглобулина. Основным фактором, регулирующим синтез ТГ, является ТТГ, увеличивающий экспрессию гена ТГ, избыток йода подавляет ТТГ-стимулированный биосинтез этого белка. Инсулин и инсулиноподобный фактор роста-1 также стимулируют синтез ТГ. Цитокины – фактор некроза опухолей- α и интерферон- γ – индивидуально или аддитивно подавляют экспрессию тиреоидспецифических генов, в том числе и ТГ. Фактор некроза опухолей- α снижает ДНК-связывающую активность тиреоидных транскрипционных факторов, что приводит к снижению экспрессии тиреоидспецифических белков. Антитиреоидные лекарственные вещества не препятствуют синтезу тиреоглобулина *de novo*, метимазол в концентрации 5 ммоль/л повышает уровень мРНК ТГ.

6. Окислительная модификация белков – йодирование

Важнейшей особенностью метаболизма клеток ЩЖ является постоянная продукция активных форм кислорода (O_2^- , H_2O_2) и йода (I_2 , I_3^+ , IO^- , IO_3^-), при стимулирующем действии ТТГ. Избыточная продукция АФК и активных форм йода (АФЙ) является фактором, индуцирующим развитие окислительного стресса в ЩЖ. *Неферментативное окисление йода* и образование его активных форм возможно при протекании следующих химических реакций в ЩЖ:





Образование активных форм йода предполагает возможным окислительное неферментативное йодирование ТГ. При инкубации ТГ контрольных и облученных крыс с KI в присутствии H_2O_2 (0,005–10,0 ммоль/л) степень йодирования белка увеличивается в 1,3–4,4 раза через 3 часа и в 1,4–6,0 раза – через 24 часа. Степень йодирования ТГ, выделенного из ЩЖ облученных крыс (5 Гр, однократно), повысилась в 2,5–8,0 раз через 24 часа. Более выраженное йодирование ТГ облученных крыс может быть обусловлено его радиационно-индуцированной модификацией. Следствием окислительной модификации ТГ является его мультимеризация, что характеризуется появлением дополнительных высокомолекулярных фракций при гель-фильтрации.

Исследование механизмов неферментативного йодирования тиреоглобулина: йодирование аминокислот. При исследовании спектральных характеристик реакции йодирования тирозина и триптофана в присутствии H_2O_2 установлено, что взаимодействие тирозина с KI протекает с образованием I_2 (350 нм) в начальный момент, дальнейшее йодирование тирозина характеризуется появлением дополнительного плеча поглощения в области 300–330 нм (рис. 4.8), что может быть следствием образования димеров тирозина.

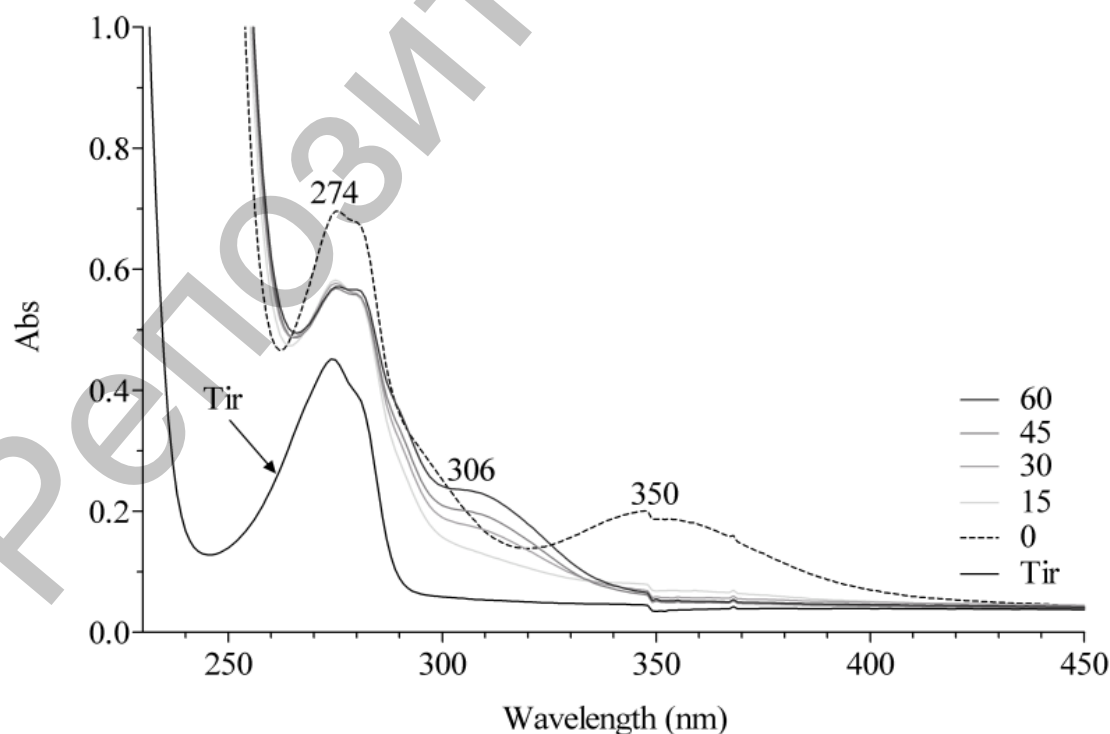


Рис. 4.8. Изменение спектральных характеристик тирозина (0,057 мг/мл) в течение 60 минут при взаимодействии с KI (0,037 ммоль/л), в присутствии H_2O_2 (3,2 ммоль/л).

Реакция йодирования триптофана сопровождается образованием соединения с максимумом поглощения при 385 нм (рис. 4.9). При гель-хроматографии продуктов реакций обнаружены 2 фракции с высокой степенью йодирования (тирозин) и одна с высокой степенью йодирования и минорными йодированными фрагментами (триптофан), что предполагает димеризацию йодированных аминокислот.

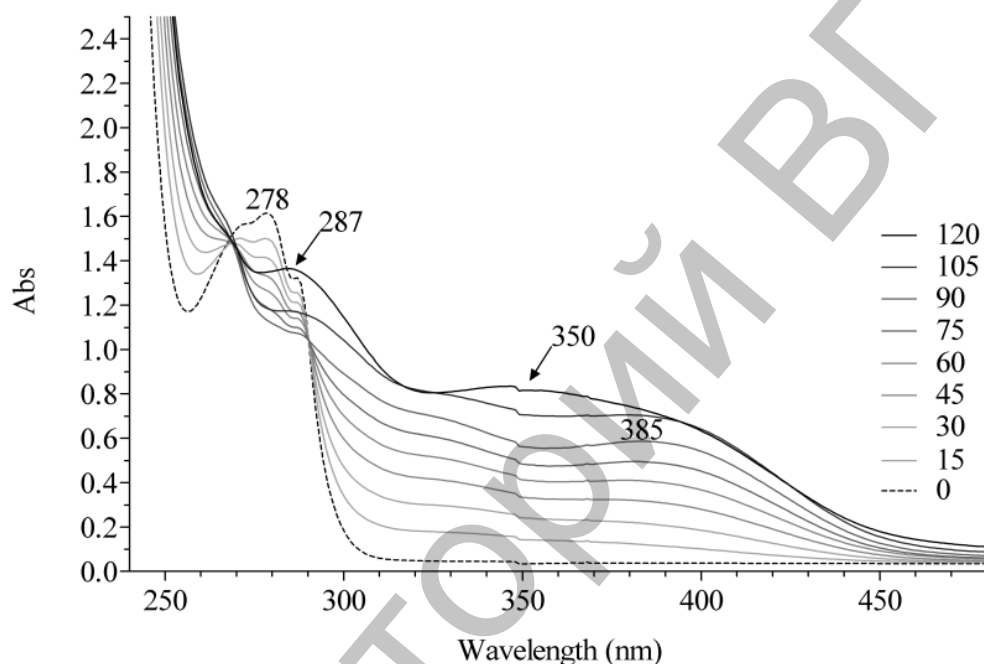


Рис. 4.9. Изменение спектральных характеристик триптофана (0,057 мг/мл) в течение 60 минут при взаимодействии с KI (0,037 ммоль/л), в присутствии H_2O_2 (3,2 ммоль/л).

Окислительная модификация ТГ (неферментативное йодирование) – следствие йодирования его аминокислот (тирозина, триптофана), что может сопровождаться их димеризацией и структурной модификацией белка. Неферментативное йодирование ТГ может быть причиной нарушения процессов ферментативного йодирования ТГ, его протеолиза, полимеризации, вызывать изменение антигенных свойств.

Окислительная модификация белков крови: йодирование. Модификация белков крови активными формами йода обнаружена в условиях индукции окислительного стресса на фоне повышенного потребления йода. После инкубации сыворотки крови крыс с KI (0,05 моль/л) в присутствии H_2O_2 (8,82–0,088 ммоль/л) йодированные белки обнаружены в нескольких фракциях. Профиль элюции йодированных белков крови крыс, стрессированных на фоне введения KI, характеризуется наличием 2 йодсодержащих

максимумов (концентрация йода в которых составляла 25,0 и 37,0 мкг/л), а также около 5 небольших белковых фракций (рис. 4.10А). Выраженное йодирование белков крови обнаружено у крыс, получавших в течение 14 дней 10 суточных доз KI на фоне воздействия γ -излучения в дозе 0,5 Гр (10-кратно) (рис. 4.10Б). В условиях индукции окислительного стресса йодируются белки основной альбуминовой фракции крови (пробы № 10–20)

и более низкомолекулярные белковые молекулы.

Представленные данные являются доказательством специфической окислительной модификации белков крови – неферментативного йодирования *in vivo*. Йодированные белки обнаружены при исследовании крови пациента, принимающего в течение месяца высокие дозы раствора люголя (2500–37950 мкг йода в сутки). Йодирование белков можно рассматривать как механизм окислительной модификации белков, и его роль в функционировании йодированных протеинов представляет интерес с точки зрения более глубокого понимания теории свободнорадикального окисления. Нет сомнений в том, что свободнорадикальные процессы, протекающие в ЩЖ, характеризуются уникальностью с точки зрения архитектоники и метаболизма. Полученные данные предполагают воз-

можным введение понятия **окислительный йодный стресс**. Оно характеризует избыточную продукцию ак-

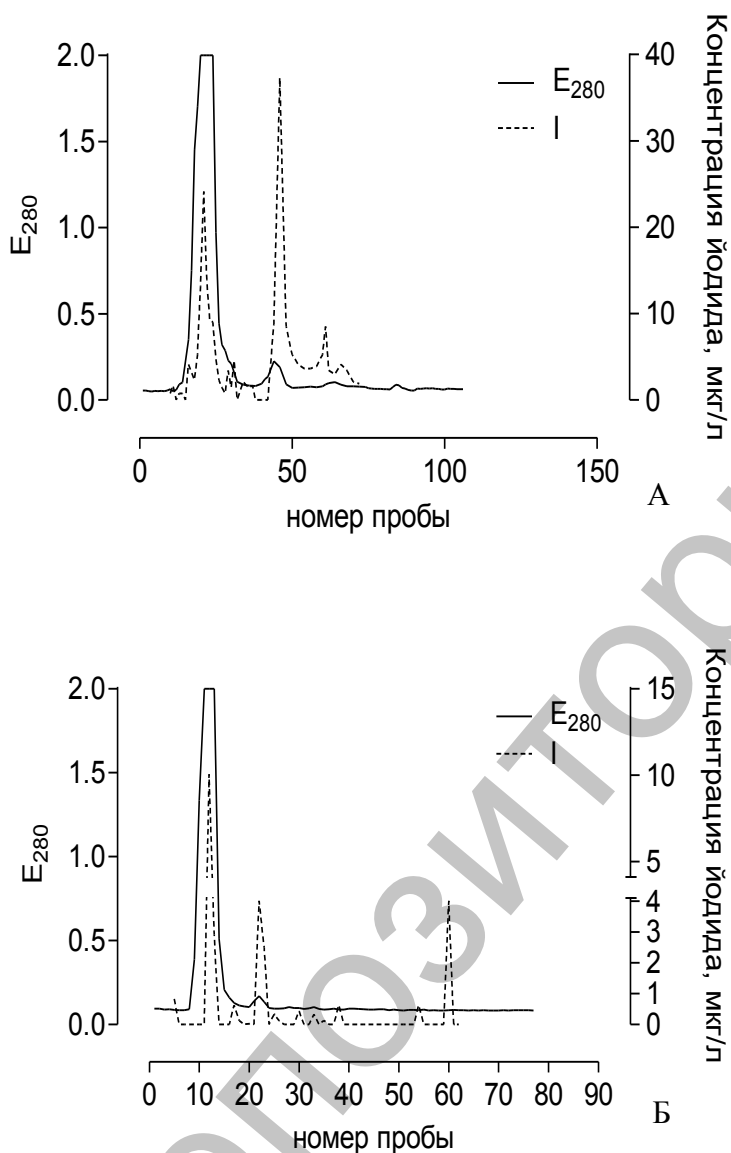


Рис. 4.10. Гель-хроматография сыворотки крыс на Тоуорепарл HW-55F в 0,01 М трис-буфере pH 8,0; колонка 80×1,6 см.

А – через 6 часов после введения 3 суточных доз KI и 30-минутного психоэмоционального стресса; Б – получавших в течение 14 дней 10 суточных доз KI на фоне воздействия γ -излучения (0,5 Гр × 10).

тивных форм йода (АФЙ–RIS) и активацию свободнорадикальных процессов, вызывающих модификацию белков, липидов, ДНК. Исследование механизмов и последствий этого типа окислительного стресса для клеток и тканей представляет значительный интерес. Однако несомненно, что длительный йодный стресс вносит определенный вклад в нарушение функции ключевых белков ЩЖ и крови.

Лабораторная работа № 1

Выделение и очистка тиреоглобулина из щитовидной железы крыс

Для выделения тиреоглобулина из ЩЖ крыс используются следующие стадии:

- центрифугирование;
- фракционирование сульфатом аммония (СА);
- гель-хроматография на Toyoparl HW-55F.

Исходным материалом для выделения тиреоглобулина служат ЩЖ 15–20 крыс (масса 330–350 мг).

Реагенты: 0,01 М Трис-НСl буфер, pH 8,0, сульфат аммония.

1 этап. Получение гомогената. Выделенные ЩЖ гомогенизируют в 0,01 М Трис-НСl буфере, pH 8,0 в стеклянном гомогенизаторе. Для частичного удаления субклеточных фракций гомогенат центрифугируют в течение 10 мин при 10000 g (4 °C). Полученный супернатант используют для дальнейшего выделения тиреоглобулина.

2 этап. Сульфат-аммонийное фракционирование. Соль сульфата аммония (СА), растертая до порошкообразного состояния, добавляется небольшими порциями в супернатант ЩЖ при постоянном перемешивании на ледяной бане. Основная масса тиреоглобулина осаждается в диапазоне 40–50% насыщения СА. Осаждаемые белки отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 10000 g (4 °C), осадок ресуспензируют в 0,01 М Трис-НСl буфере, pH 8,0.

3 этап. Гель-фильтрация. Для разделения белков по молекулярной массе и дальнейшей очистки тиреоглобулина используют гель-фильтрацию на Toyoparl HW-55F (Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd., Japan). Колонку (100 × 1,6 см), наполненную сорбентом, уравнивают в 0,01 М Трис-НСl буфере, pH 8,0. Белок наносят на колонку в объеме 2–2,5 мл. Нанесенный белок элюируют тем же буфером (со скоростью 10 мл × ч⁻¹), собирая пробы объемом 2,2–2,5 мл на коллекторе фракций (рис. 4.11).

Подтверждением высокой чистоты выделенного ТГ служит электрофорез в 5% полиакриламидном геле. Результаты очистки ТГ представлены в табл. 4.3.

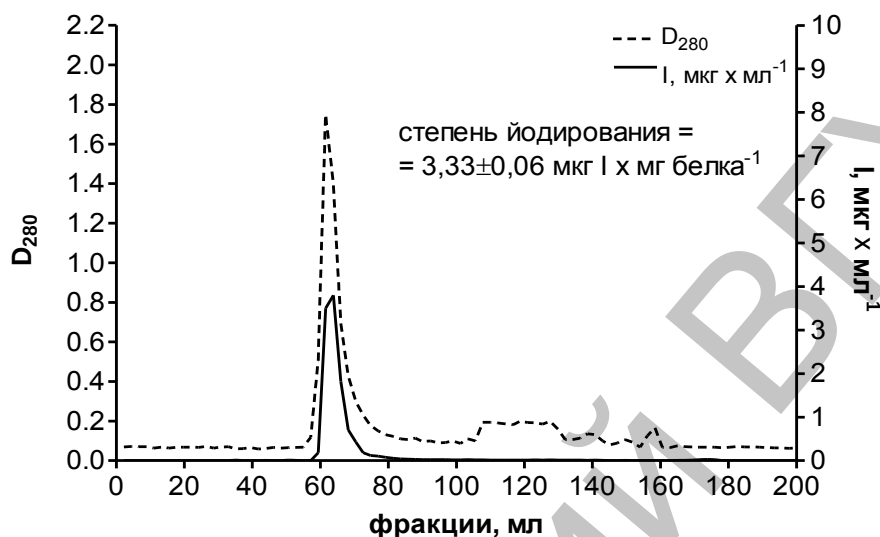


Рис. 4.11. Гель-хроматография фракции 40,0–50,0% насыщения СА крыс на Toyopearl HW-55F в 0,01 М трис-буфере pH 8,0, колонка 100×1,6 см (профиль элюции белка E_{280} и концентрации йодида, $\text{мкг} \times \text{мл}^{-1}$).

Таблица 4.3 – Очистка тиреоглобулина из ЩЖ крыс

Фракции	Объем, мл	Концентрация йодида, $\text{мкг} \times \text{мл}^{-1}$	Общее количество йодида, мкг	Концентрация белка, $\text{мг} \times \text{мл}^{-1}$	Степень йодирования, $\text{мкг I} \times \text{мг белка}^{-1}$	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат ЩЖ	4,85	6,11	29,63	5,76	1,06	100,00	1,00
Осветленный экстракт	4,65	4,53	21,07	4,52	1,00	71,11	0,94
40–50% насыщения СА	2,65	5,34	14,15	2,45	2,18	47,76	2,06
Toyopearl HW-55F	2,50	3,06	7,65	0,84	3,64	25,82	3,43

Лабораторная работа № 2

Определение активности тиреопероксидазы в щитовидной железе крыс

Определение активности ТПО основано на методе, в основе которого лежит реакция ферментативного окисления йодида по N.M. Alexander (1962). В ходе реакции образуются 2 продукта с максимумами поглощения 287 и 350 нм.

Оборудование, необходимое для работы: регистрирующий спектрофотометр типа «Cary-100», pH-метр, термостат.

Реагенты: 0,05 М фосфатный буфер (pH 7,4), 0,6 моль/л KI, 12 мкмоль/л H₂O₂.

Приготовление реагентов для проведения эксперимента:

0,05 М натрий-фосфатный буфер: 7,25 г Na₂HPO₄ × 12 H₂O и 0,74 г NaH₂PO₄ растворяют в 500 мл воды, доводят pH до 7,4.

0,6 моль/л KI: 4,98 г KI растворяют в 50 мл воды.

12 мкмоль/л H₂O₂: 0,2 мл 3% H₂O₂ растворяют в 14,5 мл воды (непосредственно перед проведением анализа).

Инкубационная среда: 2,85 мл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,4;

0,05 мл 0,6 моль/л раствора KI;

0,05 мл 12 мкмоль/л H₂O₂;

0,05 мл гомогената щитовидной железы (1:40).

Ход анализа:

В термостатируемую кювету (1 см) вносят 2,85 мл 0,05 моль/л фосфатного буфера (pH 7,4), 0,05 мл 0,6 моль/л KI и 0,05 мл гомогената ЩЖ (1:40). Реакционную среду перемешивают и инкубируют в течение 10 минут при температуре 28 °С. Реакцию запускают добавлением при перемешивании 0,05 мл 12 мкмоль H₂O₂. Скорость реакции фиксируют в течение 1 мин при длине волны 353 нм на спектрофотометре «Cary-100». Расчет активности ТПО осуществляют с использованием молярного коэффициента экстинкции для образующегося продукта $\epsilon = 22900 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ по формуле:

$$A = E \times V : \epsilon \times m/C,$$

где E – изменение оптической плотности в ходе реакции за 1 минуту,

V – объем реакционной среды, л (0,003),

ϵ – коэффициент молярной экстинкции, 22900,

m – масса ткани в граммах,

C – концентрация белка, (г_{белка}/г_{ткани}).

Активность фермента выражают в мкмоль × мин⁻¹ × г ткани⁻¹ или мкмоль × мин⁻¹ × г белка⁻¹.

Лабораторная работа № 3

Метод исследования метаболизма йода (определение концентрации общего, белковосвязанного и свободного) в щитовидной железе с использованием реакции Санделла–Кольтхоффа

Церий-арсенитный метод определения йода в моче очень широко используется и хорошо описан в литературе [Dunn J.T., Crutchfield H.E., Gutekunst R., Dunn D. Methods for measuring iodine in urine / Nederland, 1993; Селяницкая В.Г., Пальчикова Н.А., Галкин П.С. Опыт определения йода в моче кинетическим церий-арсенитным методом // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. – № 5. – С. 22–24]. В данном методе используется реакция Санделла–Кольтхоффа – измерение скорости реакции между церием (IV) и мышьяком (III) в кислой среде, специфическим катализатором которой является йод.

Оборудование, необходимое для работы: дегистор или печь для сжигания проб, спектрофотометр Spectromom-404 или Spectronic-20D (спектрофотометр для измерения оптической плотности в пробирках).

Необходимые реагенты: 3,5 н раствор H_2SO_4 , 1,2% раствор церий-аммоний сульфата (IV), 0,5% раствор арсенита натрия, свежесинтезированная HClO_3 , стандартный раствор KIO_3 .

Приготовление реагентов для проведения эксперимента:

1. **Синтез HClO_3 :** к 200 г KClO_3 добавляем 365 мл воды и подогреваем до полного растворения. Далее при нагревании и перемешивании добавляем маленькими порциями 150 мл HClO_4 (конц.). Охлаждаем до комнатной температуры и на 12–18 часов помещаем в морозильную камеру холодильника (не замораживать). Фильтруем осадок на стеклянной воронке. Для мокрого сжигания готовим смесь $\text{HClO}_3 + \text{HClO}_4$ (5:1).

2. **1,2% раствор церий аммоний сульфата:** 6 г церия аммония сульфата растворить в 500 мл 3,5 н раствор H_2SO_4 .

3. **0,5% раствора арсенита натрия:** к 5 г As_2O_3 и 12,5 г NaCl добавляем 86 мл воды и 14 мл концентрированной H_2SO_4 , растворяем при нагревании и после охлаждения доводим объем до 500 мл водой. К полученному объему добавляем 500 мл 3,5 н раствора H_2SO_4 .

4. **Стандарт йода А.** 168 мг KIO_3 растворяем в 1 л воды, храним герметично закрытым в холодильнике. **Стандарт йода Б** (рабочий раствор для построения калибровочного графика): к 20 мл воды добавляем 100 мкл стандартного раствора А. Храним в герметично закрытой посуде из темного стекла в холодильнике на протяжении 1–2 недель. Для построения калибровочного графика используются следующие концентрации стандартного раствора Б:

Номер пробы	1	2	3	4	5	6

Концентрация йода, мкг/л	0	20	50	100	150	200
Объем KIO_3 (стандарт Б), мкл	0	10	25	50	75	100
Объем H_2O , мкл	125	115	100	75	50	25

Используемые реактивы: все реактивы, используемые в работе, марки х.ч.; йодат калия, хлорат калия, триоксид мышьяка, церий-аммоний сульфат (Fluca), серная и хлорная кислоты, хлорид натрия (Россия), деионизированная тридистиллированная вода.

Подготовка материала для анализа. Гомогенат ЩЖ 1:40 готовят на 0,15 М растворе KCl в стеклянном гомогенизаторе. Определение йода проводится в свежеприготовленном гомогенате (замораживание снижает воспроизводимость результатов). Для определения йода пробы гомогената дополнительно разводятся в воде в 10–200 раз в зависимости от концентрации (в 50 раз для контрольных эутиреоидных крыс, содержащихся на стандартном рационе вивария).

Осаждение йодированных белков. Для этих целей непригоден традиционно применяемый раствор

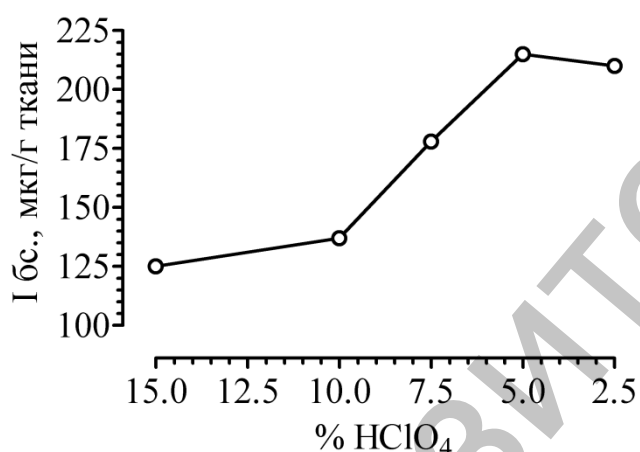


Рис. 4.12. Влияние концентрации раствора хлорной кислоты на полноту осаждения белковосвязанного йода в пробе.

хлорной кислоты (6,2% – в пробе), поскольку в этом случае степень органифицированного йода в ЩЖ низкая. Наиболее оптимальная концентрация HClO_4 – это 5,2% (в пробе соответственно 2,0%). Снижение концентрации кислоты от 15,0% до 5,2% привело к увеличению содержания йодида (в 1,75 раза) во фракции осажденных белков. Это может быть обусловлено очень высокой массой тиреогло-

булина (330–660 кД).

Белки осаждаются при центрифугировании (3000 об/мин) в течение 45 минут (1300 g). Далее из надосадочной жидкости отбирается аликвота (125 мкл) для определения не связанной с белком фракции йода, и надосадочная жидкость удаляется полностью. К осадку добавляется соответствующий объем (125 мкл) воды.

Для каждого образца ЩЖ необходимо подготовить соответственно 3 пробы:

1 проба – в которой определяется общее содержание йода (Iобщ), содержит 125 мкл гомогената ЩЖ;

2 проба – в которой определяется содержание белковосвязанной фракции йода (Iбсвяз), содержит белки 125 мкл гомогената, осажденные как представлено выше;

3 проба – в которой определяется содержание свободной фракции йода (Iсвоб), содержит 125 мкл супернатанта после осаждения белковой фракции (проба № 2).

Ход анализа:

Первым этапом определения йода является сжигание пробы, которое проводится методом мокрого сожжения в смеси хлорноватой и хлорной кислот $\text{HClO}_3 + \text{HClO}_4$ (5:1).

К каждой из трех проб (Йобщ, Йбсвяз, Йсвоб) добавляется по 0,3 мл смеси хлорноватой и хлорной кислот (5:1), сжигание проводится в течение часа при 100 °С. После охлаждения до комнатной температуры к пробам

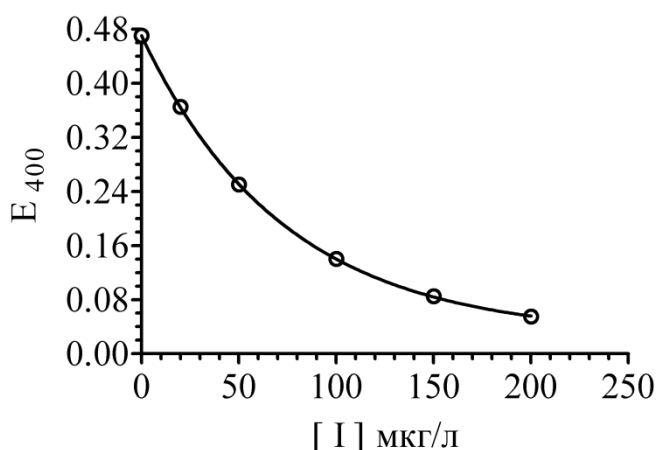


Рис. 4.13. Калибровочная кривая для определения концентрации общего, белковосвязанного и свободного йода каталитическим церий арсенитным методом.

необходимо добавить 1,0 мл 0,5% раствора арсенита натрия, перемешать и инкубировать 20 минут при 20–25 °С (температурный режим значительно влияет на скорость протекания реакции и должен поддерживаться постоянным). Далее по секундомеру в каждую пробу добавляем 0,5 мл 1,2% раствора церия аммония сульфата. Строго через 20 минут каждую пробу спектрофотометрируем непосредственно в пробирке на приборе

«Spectromom-401» (Венгрия) при длине волны 400 нм. Калибровочная кривая строится при каждом проведении анализа (рис. 4.13).

В одной серии анализов Йобщ, Йбсвяз и Йсвоб могут определяться в 20–25 пробах.

Расчет результатов проводится по формулам

$$\text{Йобщ} = (A \times \text{разведение}) : 25;$$

$$\text{Йбсвяз} = (A \times \text{разведение}) : 25;$$

$$\text{Йсвоб} = (A \times \text{разведение}) : 25$$

и выражается в мкг I/г ткани. Где А – концентрация йода в пробе, рассчитанная по калибровочному графику (в программе Graph Pad Software, США).

Апробация метода в экспериментальных моделях. Разработанный метод определения йодида в ЩЖ апробирован в экспериментальных исследованиях. Содержание общего, белковосвязанного и свободного йодида определялось в ЩЖ крыс, содержащихся на стандартном рационе вивария, получавших высокие дозы йодида калия, животных с йодным дефицитом (табл. 4.4). Исследование соотношения различных фракций йодида в ткани

ЩЖ позволяет характеризовать динамику процессов поглощения и органификации йодида. Как видно данных табл. 4.3, снижение соотношения $I_{бс}/I_{о}$, и повышение $I_{св}/I_{бс}$ при избыточном употреблении йода свидетельствует о снижении степени органификации йода в ЩЖ.

Таблица 4.4 – Концентрация общего, белковосвязанного и свободного йода в ткани ЩЖ, данные экспериментальных исследований

Показатель	Контрольная группа	Введение 35 мкг КІ на протяжении 14 недель	Низкойодная диета в течение 12 недель
Йод общий, мкг/г ткани	349,1±5,29	732,85±43,43	46,47±8,62
Йод белковосвязанный, мкг/г ткани	290,7±12,65	348,29±40,78	30,92±6,06
Йод свободный, мкг/г ткани	83,26±9,65	245,03±29,29	5,65±3,78
Соотношение $I_{бсв}/I_{обш}$	0,833±0,042	0,598±0,024	0,836±0,174
Соотношение $I_{своб}/I_{бсв}$	0,286±0,025	0,703±0,043	0,121±0,03

Лабораторная работа № 4

Определение концентрации йода в водных растворах с использованием крахмального геля

Для определения йода в водных растворах используется хорошо известная качественная реакция – синее окрашивание крахмального геля в присутствии йода. Построение калибровочного графика с измерением оптической плотности раствора при 760 нм позволяет количественно определять концентрацию йода в водных растворах с концентрацией 5–600 мг/л.

Цель работы: построение калибровочного графика и определение концентрации йода в водных растворах Люголя, йодной настойки.

Оборудование: спектрофотометр СФ-46 (или любой другой).

Реагенты для работы: свежеприготовленный 2% крахмальный гель, раствор йода с заданной концентрацией 1250 мг/мл для построения калибровочного графика.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика готовится серия растворов с концентрацией йода 4,88; 9,76; 19,5; 39,1; 78,1; 156,0; 312,5; 625,0 мг/л путем кратного разведения стандартного раствора, содержащего 1250 мг/л йода.

Ход анализа:

В пробирки вносится по 2,5 мл стандартного калибровочного раствора и раствора с неизвестной концентрацией йода; в каждую пробирку добавляется 150 мкл жидкого крахмального геля, содержимое пробирок пе-

ремешивается. Измерение оптической плотности окрашенных растворов проводится при 760 нм в кювете 1 см. Результаты представлены в табл. 4.5. Калибровочная кривая представлена на рис. 4.14, в диапазоне 0–30 мг/л отмечается линейная зависимость. Концентрация йода в исследуемых образцах определяется по калибровочному графику.

Таблица 4.5 – Данные для построения калибровочного графика

Номер пробы	Концентрация йода в пробе (мг/л)	Оптическая плотность при 760 нм
1	4,88	0,067
2	9,76	0,080
3	19,5	0,260
4	39,1	0,440
5	78,1	0,550
6	156,0	0,670
7	312,5	0,765
8	625,0	0,840
9	1250,0	>1.0

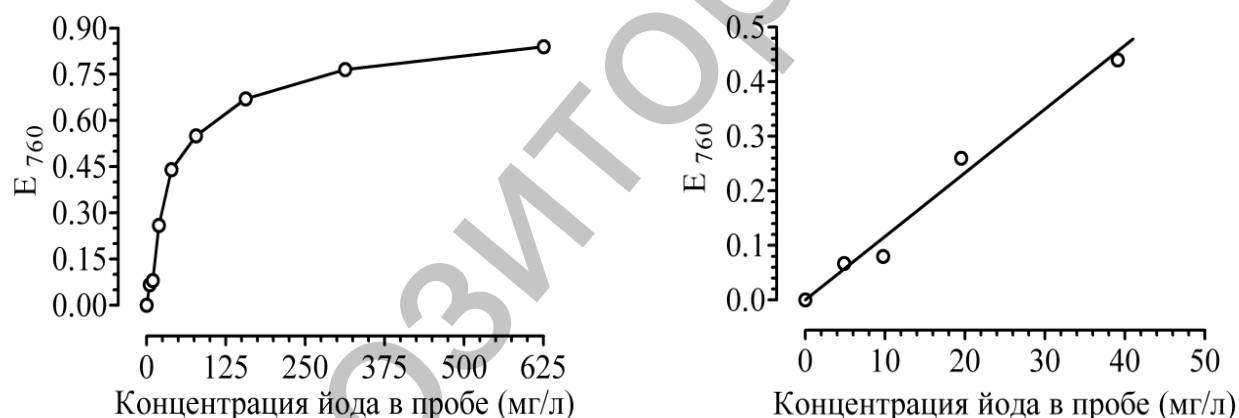


Рис. 4.14. Калибровочная кривая для определения концентрации йода в водных растворах с использованием крахмального геля.

Контрольные вопросы

1. Какова биологическая роль йода?
2. Дайте характеристику дейодиназам.
3. Какие биохимические механизмы используются для переноса йода в клетку?
4. Опишите механизмы регуляции поглощения йода клетками щитовидной железы.

5. *Как происходит окисление и органификация йода?*
6. *Дайте характеристику ферментам тиреопероксидаза и тиреооксидоредуктаза.*
7. *Каковы молекулярные различия ферментативного и неферментативного окисления йодида?*
8. *Охарактеризуйте йодсодержащие белки.*
9. *Опишите тиреоглобулин.*
10. *Как происходит окислительная модификация белков – йодирование?*
11. *Как анализируют йодирование аминокислот и белков?*
12. *Опишите принципы методов исследования метаболизма йода (определение концентрации общего, белковосвязанного и свободного).*
13. *Для каких целей можно использовать определение концентрации йода в водных растворах с использованием крахмального геля?*

Литература

1. Болезни щитовидной железы в Республике Беларусь в современных экологических условиях / В.М. Дрозд [и др.] // Вести НАН Беларуси. – 2006. – № 2. – С. 103–111.
2. Валентюкевич, О.И. Роль тиреоидных гормонов в регуляции свободно-радикальных процессов в клетках и тканях: монография / О.И. Валентюкевич, Л.И. Надольник. – Гродно: ГГАУ, 2009. – 260 с.
3. Зобная эндемия и йодная недостаточность у детей и подростков Республики Беларусь (результаты совместного международного исследования) / А.Н. Аринчин [и др.] // Здоровоохранение. – 2000. – Т. 11. – С. 25–30.
4. Надольник, Л.И. Влияние H_2O_2 -индуцированного окислительного стресса на метаболизм йодида в тироцитах щитовидной железы крыс / Л.И. Надольник, З.В. Нецецкая // Весці НАН Беларусі, сер. Біял. навук. – 2008. – № 1. – С. 90–95.
5. Надольник, Л.И. Состояние тироцитов крыс при окислительном стрессе / Л.И. Надольник // Пробл. эндокринол. – 2005. – Т. 51, № 4. – С. 38–41.
6. Надольник, Л.И. Влияние кратковременного ежедневного стрессорного воздействия в течение месяца на метаболизм йода в щитовидной железе крыс / Л.И. Надольник, С.В. Лупачик, С.С. Чумаченко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2009. – № 3. – С. 77–83.
7. Щитовидная железа. Фундаментальные аспекты / А.И. Кубарко [и др.]; под ред. А.И. Кубарко и С. Ямашита. – Минск–Нагасаки, 1998. – 368 с.

8. Bizhanova, A. The Sodium-Iodide Symporter NIS and Pendrin in Iodide Homeostasis of the Thyroid / A. Bizhanova, P. Kopp // *Endocrinology*. – 2009. – Vol. 150, № 3 – P. 1084–1090.
9. Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling / B. Gereben [et. al.] // *Endocrine Reviews*. – 2008. – Vol. 9, № 7. – P. 898–938.
10. Dunn, J.T. Update on intrathyroidal iodine metabolism / J.T. Dunn, A.D. Dunn // *Thyroid*. – 2001. – Vol. 11, № 5. – P. 407–414.
11. Kessler, J. Factors influencing the study of peroxidase-generated iodine species and implications for thyroglobulin synthesis / J. Kessler, C. Obinger, G. Eales // *Thyroid*. – 2008. – Vol. 18, № 7. – P. 769–774.
12. Nadolnik, L.I. Free Radical processes in thyroid cells: role of reactive oxygen and iodine species / L.I. Nadolnik // *Handbook of free radicals: formation, types and effects* / Editors: D. Kozyrev, V. Slutsky. – N. Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2010. – Chapter 7. – P. 197–261.
13. Nadolnik, L.I. Effect of oxidative stress on rat thyrocyte iodide metabolism / L.I. Nadolnik, Z.V. Niatsetskaya, S.V. Lupachyk // *Cell. Biochem. Funct.* – 2008. – Vol. 26, № 3. – P. 366–373.
14. Roles of Hydrogen Peroxide in Thyroid Physiology and Disease / Y. Song [et. al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2007. – Vol. 92, № 10. – P. 3764–3773.
15. Rapid regulation of thyroid sodium–iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine / A.C. Ferreira [et. al.] // *J. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 184, № 1. – P. 69–76.

Г Л А В А 5. МИТОХОНДРИИ И СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ

Энергетика биологических мембран представляет одну из точек роста современной биохимии, физико-химической биологии. Митохондрии играют ключевую роль в координации важнейших клеточных функций, являясь не только источником энергетических эквивалентов, но и мишенью, декодером и коммутатором внутриклеточных сигналов, генератором вторичных мессенджеров и проапоптотических факторов. Современным направлением биохимии, физиологии, медицины является подход к патогенезу и лечению патологии, предполагающий определяющую роль митохондрий в формировании физиологических и патологических состояний организма и разрабатывающий способы направленной коррекции нарушений митохондриальных процессов.

Энергопреобразующие мембраны способны к трансформации химической энергии окисляемых субстратов, АТФ либо энергии светового излучения в электрическую энергию, а именно в трансмембранную разность электрических потенциалов $\Delta\Psi_m$ или в энергию разности концентраций веществ в растворах, разделенных мембраной (осмотическую энергию). Энергопреобразующими мембранами являются внутренняя мембрана митохондрий, внутренняя (цитоплазматическая) мембрана бактериальных клеток, мембраны тилакоидов хлоропластов и цианобактерий. Энергетические ресурсы, потребляемые мембранной системой, первоначально используются для транспорта сопрягающего иона через мембрану в направлении большей его концентрации (этот процесс называется энергизацией мембраны), затем энергия, накопленная в электрической и осмотической форме, используется в качестве движущей силы, способной совершать ту или иную работу. Современные представления о векторной биохимии процессов трансдукции энергии в митохондриальной мембране были сформированы после создания Питером Митчеллом хемиосмотической теории синтеза АТФ: в 1961 г. им было постулировано, что в энергопреобразующих мембранах роль сопрягающего иона играет H^+ .

Изолирование митохондриальных белков Д.Е. Грином с сотрудниками привело к формированию представления о «комплексах» дыхательной цепи. В 1955 г. Б. Чанс и коллеги, используя спектрофотометрические методы, определили окислительно-восстановительные уровни компонентов дыхательной цепи и при добавлении АДФ к изолированным митохондриям идентифицировали участки электронтранспортной цепи (ЭТЦ), которые по своим термодинамическим и кинетическим характеристикам были способны к трансдукции энергии.

1. Структурно-функциональная организация митохондрии

Митохондрия имеет две мембраны: внутреннюю (ВММ) и наружную (НММ), и, соответственно, две камеры, отделенные друг от друга внутренней мембраной. НММ проницаема для малых молекул и ионов, которые перемещаются через трансмембранные каналы, сформированные семейством интегральных мембранных белков – поринов. Имеются также потенциал-чувствительные анионные каналы (порины) НММ, которые позволяют обмениваться метаболитами между митохондрией и цитоплазмой. *Внутренняя мембрана непроницаема для H^+ , и это чрезвычайно важное свойство мембраны является ключевым для митохондриальной трансдукции энергии.* Химические вещества, такие, как ионы и малые молекулы, которые пересекают внутреннюю мембрану, имеют специфические транспортеры. ВММ содержит как интегральные белки – дыхательные комплексы электронтранспортной цепи переноса электронов, так и АТФ-синтазный комплекс.

Компоненты митохондриальной дыхательной цепи и дыхательные комплексы. Митохондриальная дыхательная цепь состоит из ряда переносчиков электронов, которые функционируют как окислительно-восстановительного пары, представляя собой простетические группы интегральных белков. Выделяют четыре транспортера электронов, или дыхательных комплекса, которые катализируют процесс переноса электронов по ЭТЦ. Помимо дыхательных комплексов в переносе электронов участвуют и низкомолекулярные переносчики (челноки), такие, как убихинон и цитохром *c*.

Комплекс I (НАДН-убихиноноксидоредуктаза; НАДН-дегидрогеназа) состоит из 42–43 различных полипептидов, включая ФМН (флавинаденинмононуклеотид) – содержащий флавопротеид и 6 железо-серных центров. Комплекс I по своей структуре имеет L-форму с двумя «руками»: длинной «рукой», состоящей из гидрофобного мембранного белка, находящегося в липидном слое внутренней митохондриальной мембраны, и короткой «рукой», имеющей гидрофильную часть, выступающую в матрикс и содержащую FMN и активный центр связывания НАДН.

Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа; сукцинат-убихинон оксидоредуктаза) – мембраносвязанный компонент цикла лимонной кислоты (цикла Кребса), который функционирует и как фрагмент митохондриальной дыхательной цепи. В составе комплекса II – интегрального белка – имеются ковалентно связанный ФАД (флавинадениндинуклеотид) и железо-серные центры, локализованные в мембранном внешнем домене, которые катализируют перенос электронов от сукцината к убихинону и гему цитохрома *b*, находящемуся в гидрофобном мембранном домене.

Убихинон – растворимый в липидной фазе бензохинон с длинной боковой изопреноидной цепью, который способен перемещаться путем диффузии в каждом из двух слоев фосфолипидов внутренней мембраны и обеспечивать челночный перенос электронов между мембранными белками. Убихинон является сборщиком электронов, поступающих из комплексов I и II и некоторых других источников.

Комплекс III (комплекс цитохромов bc_1 ; убихинон-цитохром с оксидоредуктаза) состоит из 9–10 полипептидов, 3 из которых участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. В частности, это гемы цитохромов b_{562} , b_{566} , c_1 и a ($2Fe-2S$). Кроме того, с двумя отдельными доменами комплекса III связаны две молекулы убисемихинона. Цитохром c является периферическим белком, расположенным на внутренней мембране со стороны межмембранного пространства, который легко растворяется в солевых средах. Цитохром c переносит электроны от комплекса I к центру Cu_A комплекса IV.

Комплекс IV (цитохром c оксидаза; цитохромоксидаза; цитохром c - O_2 оксидоредуктаза) – финальный катализатор дыхательной цепи митохондрий. Функция комплекса IV заключается в восстановлении O_2 до H_2O путем передачи четырех электронов от восстановленного цитохрома c при использовании 4-х протонов из матрикса.

Эти комплексы и убихинон обеспечивают эффективный перенос электронов. Отдельная митохондрия печени содержит ≈ 10000 полных дыхательных комплексов. Комплексы I, III и IV взаимодействуют между собой с образованием суперкомплексов.

Электрохимические потенциалы компонентов митохондриальной дыхательной цепи. Электроны, последовательно окисляя компоненты электронтранспортной цепи, поступают от доноров электронов – НАДН или сукцината к акцептору – O_2 . Комплексы I, III и IV функционируют как протонные насосы, которые «питаются» свободной энергией сопряженных окислительно-восстановительных реакций, протекающих в митохондрии, при этом катализируемое окисление и выброс H^+ являются векторными (строго направленными) и сопряженными реакциями. Движение H^+ осуществляется в направлении от матрикса к межмембранному пространству, благодаря чему матрикс заряжается «отрицательно», а межмембранное пространство – «положительно». Химическая свободная энергия падения окислительно-восстановительного потенциала электронов, проходящих через дыхательные комплексы, используется для создания протонного электрохимического градиента (потенциала $\Delta\mu_H$), выражаемого в единицах электрического потенциала и называемого протон-движущей силой – Δp , которая рассчитывается по уравнению:

$$\Delta p \text{ (мВ)} = \Delta \Psi_m - (2.3 RT/F) \Delta pH,$$

где $\Delta \Psi_m$ – трансмембранный электрический потенциал внутренней митохондриальной мембраны, ΔpH – градиент pH на внутренней мембране; R, T, и F – газовая постоянная, абсолютная температура и константа Фарадея соответственно. При температуре 37 °C $\Delta p = \Delta \Psi_m - 60\Delta pH$. Основной вклад в создание Δp в большинстве случаев вносит $\Delta \Psi_m$, который количественно составляет примерно 150–180 мВ, Δp равен 200–220 мВ. Δp – движущая сила процесса фосфорилирования АДФ и торможения потока электронов в контролируемом метаболическом состоянии (в отсутствие АДФ). Протонный потенциал $\Delta \mu_H$ состоит, как показано, из двух компонентов: 1) электрического ($\Delta \Psi_m$) и 2) химического или осмотического (ΔpH). Биофизическая основа дыхательного контроля заключается в том, что Δp в состоянии остановить экзергоническое окисление субстратов вследствие установления равновесия между свободной энергией электронного потока между окислительно-восстановительными парами ЭТЦ и потоком H^+ между камерами митохондрии. Кроме того, мембранный потенциал обеспечивает движущую силу для переноса катионов в митохондрию, таких, как K^+ и Ca^{2+} .

2. Роль электрохимического потенциала и F_1 -АТФ-азного молекулярного ротора в фосфорилировании АДФ

В целом процесс окислительного фосфорилирования критически зависит от целостности и непроницаемости внутренней митохондриальной мембраны. Первая часть процесса заключается в преобразовании химического потенциала НАДН и энергии окисления янтарной кислоты (сукцината) в H^+ электрохимический градиент, вторая часть – в катализируемом АТФ-синтазой эндергоническом синтезе АТФ за счет использования энергии протонного градиента. Этот процесс термодинамически возможен, поскольку освобождаемая энергия при переносе электронов по ЭТЦ и движущая протонная сила сохраняют достаточно свободной энергии, приблизительно 34 кДж на моль электронной пары, чтобы привести к ресинтезу одного моля АТФ, требующему ≈ 32 кДж.

Митохондриальная АТФ-синтаза (комплекс V) является АТФ-азой F-типа, имеющей два компонента: F_1 – периферический мембранный белок и F_0 – интегральный белок, являющийся неотъемлемой частью ВММ. Каталитический домен F_1 – шаровидное сообщество 5 белков – α , β , γ , δ и ϵ со стехиометрией 3:3:1:1:1, где γ -, δ - и ϵ -субъединицы формируют основу белкового ансамбля. Субъединицы АТФ-синтазы осуществляют вращение с частотой 50–100 тактов в секунду, что чрезвычайно важно для выполне-

ния ее функции. Вращение использует энергию H^+ потока и осуществляется в F_0 субъединице. Для осуществления функции комплекса V необходимо наличие АДФ. Градиенты АДФ и АТФ на внутренней мембране уравниваются активностью транслоказы адениннуклеотидов, которая обеспечивает поступление АДФ в матрикс и АТФ в цитозоль.

Экспериментально установлено, что для синтеза одной молекулы АТФ требуется перемещение в матрикс $\approx 4 H^+$. Эффективность фосфорилирования в изолированной митохондрии определяется как отношение АДФ/О с экспериментальными значениями 2,5 для НАД-зависимых субстратов и 1,5 для окисления сукцината.

3. Митохондриальная секвестрация Ca^{2+}

Добавление ионов Ca^{2+} к изолированным митохондриям даже в присутствии АДФ приводит к их энергозависимому захвату (секвестрации) митохондриями при прекращении синтеза АТФ. Митохондрия поглощает Ca^{2+} в обмен на H^+ в процессе, приводимом в действие АТФ или мембранным потенциалом, которые управляют Ca^{2+}/H^+ – насосом со стехиометрией 1:1. Митохондрии способны к накоплению большого количества Ca^{2+} с одновременным поглощением P_i . Ca^{2+} при этом может осаждаться в матриксе в виде гидроксиапатита, что не приводит к значительному изменению концентрации его растворенной фракции. Другой путь поступления Ca^{2+} в митохондрию функционально связан с открытием Ca^{2+} -опосредованных пор высокой проницаемости. Внутримитохондриальный Ca^{2+} является аллостерическим активатором некоторых матриксных дегидрогеназ, таких, как НАДН-изоцитратдегидрогеназа, пируватдегидрогеназа, α -кетоглутаратдегидрогеназа, и кофактором митохондриальной NO-синтазы (mtNOS).

4. Митохондриальные поры высокой проницаемости

Под действием активных форм кислорода (АФК) в АТФ/АДФ антипортере – белке внутренней мембраны митохондрий – происходит окисление SH – группы Cys-56, что приводит к превращению этого переносчика адениннуклеотидов в неспецифический канал, проницаемый для любых низкомолекулярных веществ. По-английски этот канал называется «permeability transition pore» (mPTP) – пора, вызывающая переход мембраны митохондрий в состояние высокой проницаемости. Согласно общепринятой модели, в формировании mPTP участвуют такие белки, как адениннуклеотидтранслокатор внутренней митохондриальной мембраны, потенциал-зависимый анионный канал (the voltage-dependent anion channel, VDAC) внешней митохондриальной мембраны, циклофилин Д (cyclophilin)

матрикса митохондрий, обеспечивающий чувствительность поры к циклоспорину А, закрывающему пору. Чувствительность митохондрий к переходу в состояние высокой проницаемости (permeability transition) может возрастать под действием различных факторов: окислительного стресса, повышения уровня неорганического фосфата P_i , истощения аденин нуклеотидов. Через открытую mPTP во внутренней митохондриальной мембране диффундирует вода и вещества размером до 1500 Да, что приводит к набуханию митохондрий и выбросу поглощенного Ca^{2+} . Формирование mPTP играет решающую роль в многообразных физиологических и патологических процессах в клетке.

5. Генерация АФК и антиоксидантная защита митохондрий

Главным источником активных форм кислорода (АФК) в клетке является митохондриальное дыхание. Предполагают, что в сердце и печени крысы на митохондриальную продукцию H_2O_2 расходуется $\approx 0,5\%$ от общего количества физиологического органического потребления O_2 при использовании в качестве субстратов сукцината или малата-глутамата и $\approx 0,15\%$ – при использовании в качестве субстрата пальмитоил-карнитина. Впервые А. Боверис и Б. Чанс в 1972–1973 гг. показали, что изолированные митохондрии печени и сердца животных являются активными источниками пероксида водорода (H_2O_2), который способен диффундировать в цитозоль. Несколько позже было установлено, что стехиометрическим предшественником митохондриального H_2O_2 является супероксиданион (O_2^-), а главным источником образования O_2^- в митохондриях было признано аутоокисление убисемихинона (UQH). В настоящее время известно, что O_2^- образуется за счет утечки электронов из комплексов I, II, III электронтранспортной цепи переноса электронов (ЭТЦ) к молекулярному кислороду.

Существенным прорывом в исследовании митохондриальных свободно-радикальных процессов была недавняя демонстрация кинетики образования O_2^- в митохондриях живых клеток и органов. Так, в культуре клеток, нагруженных желтым флуоресцирующим белком – новым биосенсором O_2^- , который не реагировал с другими АФК в клетке, такими, как H_2O_2 , пероксинитрит, гидроксил-радикал или NO, исследователи обнаружили вспышки флуоресценции в отдельных митохондриях или группах функционально сопряженных митохондрий, отражающие продукцию O_2^- . В результате выброса O_2^- наблюдалось открытие mPTP без взаимосвязи с освобождением ионов Ca^{2+} . Инициированные O_2^- mPTP требовали функционирования ЭТЦ и были АТФ-зависимыми. Генерирование O_2^- коррелировало с преходящим снижением мембранного потенциала, матриксным

ацидозом и набуханием митохондрий. Аноксия или умеренная гипоксия уменьшали частоту всплесков O_2^- в кардиомиоцитах, что подчеркивает роль избирательной продукции АФК в нормальных процессах клетки, использующей скэвенджерные и детоксицирующие АФК-системы в сигнальных каскадах, так же, как киназы, фосфатазы, мембранные каналы и транспортеры. Однако, некоторые исследователи оспаривают положение о том, что митохондрии являются основным продуцентом O_2^- и H_2O_2 в тканях млекопитающих, утверждая, что генерация свободных радикалов митохондриями может быть результатом нарушения целостности митохондриальной мембраны при изолировании митохондрий.

К генерации АФК способны многие митохондриальные ферменты (второй источник АФК), в частности, два фермента цикла Кребса (аконитаза и α -кетоглутаратдегидрогеназа) пируватдегидрогеназа и глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, дигидрооротат-дегидрогеназа, моноаминоксидазы А и В и цитохром *b5* редуктаза.

Третий важный источник продукции митохондриальных АФК представлен митохондриальной NO-синтазой (mtNOS). В гепатоцитах и кардиомиоцитах NOS локализована внутри митохондрий, тогда как в митохондриях эндотелиальных клетках она состыкована с эндоплазматической стороной внешней митохондриальной мембраны.

Основное количество образующегося в митохондриальной ЭТЦ O_2^- (70–80%) поступает в матрикс, а 20–30% – в межмембранное пространство.

Образование H_2O_2 модулируется метаболическим состоянием митохондрий и внутримитохондриальной концентрацией NO. Так, продукция H_2O_2 в метаболическом состоянии IV примерно в 4–5 раз выше, чем в метаболическом состоянии III и составляет $0,3–0,8 \text{ нмоль } H_2O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$ для состояния IV и только $0,05–0,15 \text{ нмоль } H_2O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$ для состояния III соответственно. Потоки ионов через внутреннюю митохондриальную мембрану оказывают сильное воздействие на скорость образования H_2O_2 , указывая на регулируемую роль мембранного потенциала в процессе аутоокисления UQH $^+$.

6. Митохондриальное образование NO

Синтез оксида азота осуществляется в ферментативной реакции, катализируемой NOS, которая требует присутствия аргинина, НАДФН и O_2 как субстратов. В результате реакции образуются цитруллин, H_2O и NO. Известны три различных геномных NOS: нейрональная NOS (nNOS, или номер 1); индуцибельная NOS макрофагов (iNOS, или номер 2) и эндотелиальная NOS (eNOS, или номер 3). Двумя независимыми группами исследо-

вателей митохондрии были признаны одним из источников оксида азота. Митохондриальный NO продуцируется изоформой митохондриальной NO-синтазы. Физиологическая продукция NO ферментом взаимосвязана с регулированием *cyt-c*-оксидазной активности: повышение уровня NO снижает *cyt-c*-оксидазную активность за счет S-нитрозилирования остатков цистеина в комплексах IV и I. В состоянии разобщения эндотелиальная NOS (eNOS) генерирует супероксид анион-радикал. Митохондриальная NO-синтаза была идентифицирована как вариант посттрансляционной модификации nNOS, заключающейся в ее миристилировании и фосфорилировании. Известно, что для протекания ферментативной реакции синтеза NO концентрации НАДФН, аргинина, O_2 и Ca^{2+} в митохондрии находятся в избытке или в необходимом диапазоне. Митохондриальные и субмитохондриальные препараты синтезируют NO со скоростью $0,25\text{--}0,90 \text{ нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$. Было рассчитано, что внутримитохондриальные стационарные концентрации NO составляют $50\text{--}200 \text{ нМ}$, а выброс NO, измеренный электрохимически в отдельной митохондрии после добавления Ca^{2+} , составил 29 нМ . В физиологических условиях насыщение ткани O_2 составляет $\approx 25 \text{ мМ}$, а митохондриальное отношение $[O_2]/[NO] \approx 150\text{--}300$, что поддерживает ингибирование цитохромоксидазы на $25\text{--}50\%$. Показано, что NO, продуцируемый NO-донорами или mtNOS, ингибирует комплекс III ЭТЦ (50% -ное ингибирование переноса электронов между цитохромами *b* и *c* происходит при концентрации NO, равной $0,2\text{--}0,4 \text{ мМ}$) и увеличивает образование $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в митохондриях и субмитохондриальных частицах. Этот механизм часто включается в молекулярные процессы неврологических болезней.

Внутримитохондриальный метаболизм свободных радикалов.

Внутримитохондриальные метаболиты $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO и $ONOO^-$ являются прооксидантами, потенциально приводящими к окислительному стрессу, и в настоящее время рассматриваются как факторы, определяющие молекулярный механизм дисфункции ткани при воспалении, неврологических болезнях, старении. Два из них, $O_2^{\cdot-}$ и NO, являются свободными радикалами; однако в силу своей слабой реакционности они не участвуют в реакциях «разветвления», а только лишь в реакциях «обрыва цепи», приводящих к образованию H_2O_2 и $ONOO^-$. Последние два соединения потенциально опасны, так как после гомолитического расщепления они участвуют в генерации высоко реактивного гидроксильного радикала ($OH^{\cdot}$) и свободного радикала $NO_2^{\cdot}$, который включается в нитрование белка.

Образование NO и H_2O_2 в митохондриях печени крысы имеет экспоненциальную зависимость от величины мембранного потенциала. В матриксе митохондрии метаболизм NO и $O_2^{\cdot-}$ не связан с диффузионным огра-

нением реакции, приводящей к образованию пероксинитрита ($\text{NO} + \text{O}_2^- \Rightarrow \text{ONOO}^-$). Этот окислительный путь использования NO (80%) является главным в метаболизме и использует только незначительную часть O_2^- (15%), тогда как восстановление NO убихинолом и цитохромоксидазой обеспечивает использование примерно 20% NO в митохондриях.

Пероксинитрит – сильный окислитель, который, как заряженная форма NO, быстро диффундирует из внутримитохондриального пространства. Пероксинитрит необратимо ингибирует комплексы I и III, а поддержание высокого уровня ONOO^- в митохондриях приводит к их дисфункции и апоптозу клетки. Уровень ONOO^- в матриксе митохондрии в физиологических условиях находится в диапазоне 2–5 nM, а уровни выше 20–30 нм считают цитотоксическими. Митохондриальную дисфункцию связывают с избытком NO и ONOO^- при ишемии/реперфузии, воспалении и старении. В матриксе митохондрий пероксинитрит быстро реагирует с CO_2 с образованием аддукта ONOOOCO_2^- ($k = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), который также участвует в реакциях нитрования и окисления белков и липидов. Формирование аддукта уменьшает стационарный уровень ONOO^- от 30 нм до 2 нм и считается одним из путей детоксикации митохондриального ONOO^- при высокой митохондриальной концентрации CO_2 (1 mM).

7. Митохондриальная антиоксидантная защита

Митохондрия имеет многоуровневую систему ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты, обеспечивающей детоксикацию образуемых АФК. Ферментативные компоненты включают марганец-содержащую супероксиддисмутазу (MnSOD), каталазу, глутатионпероксидазу и фосфолипидгидропероксид глутатионпероксидазу (восстанавливает гидроперекиси фосфолипидов, липопротеинов и сложных эфиров холестерина), а также ферменты, включаемые в восстановление окисленных форм малых антиоксидантных молекул, такие, как глутатионредуктаза, ответственная за восстановление тиолов белков, тиоредоксинредуктаза, глутаредоксин редуктаза и пероксиредоксин. Для регенерации глутатиона глутатионредуктазой и восстановления тиоредоксина 2 тиоредоксинредуктазой необходимо присутствие НАДФН. Неферментативные компоненты антиоксидантной защиты включают ряд гидрофильных и липофильных акцепторов свободных радикалов, таких, как цитохром c, α -токоферол, аскорбиновая кислота, восстановленная форма кофермента Q_{10} и восстановленный глутатион (GSH).

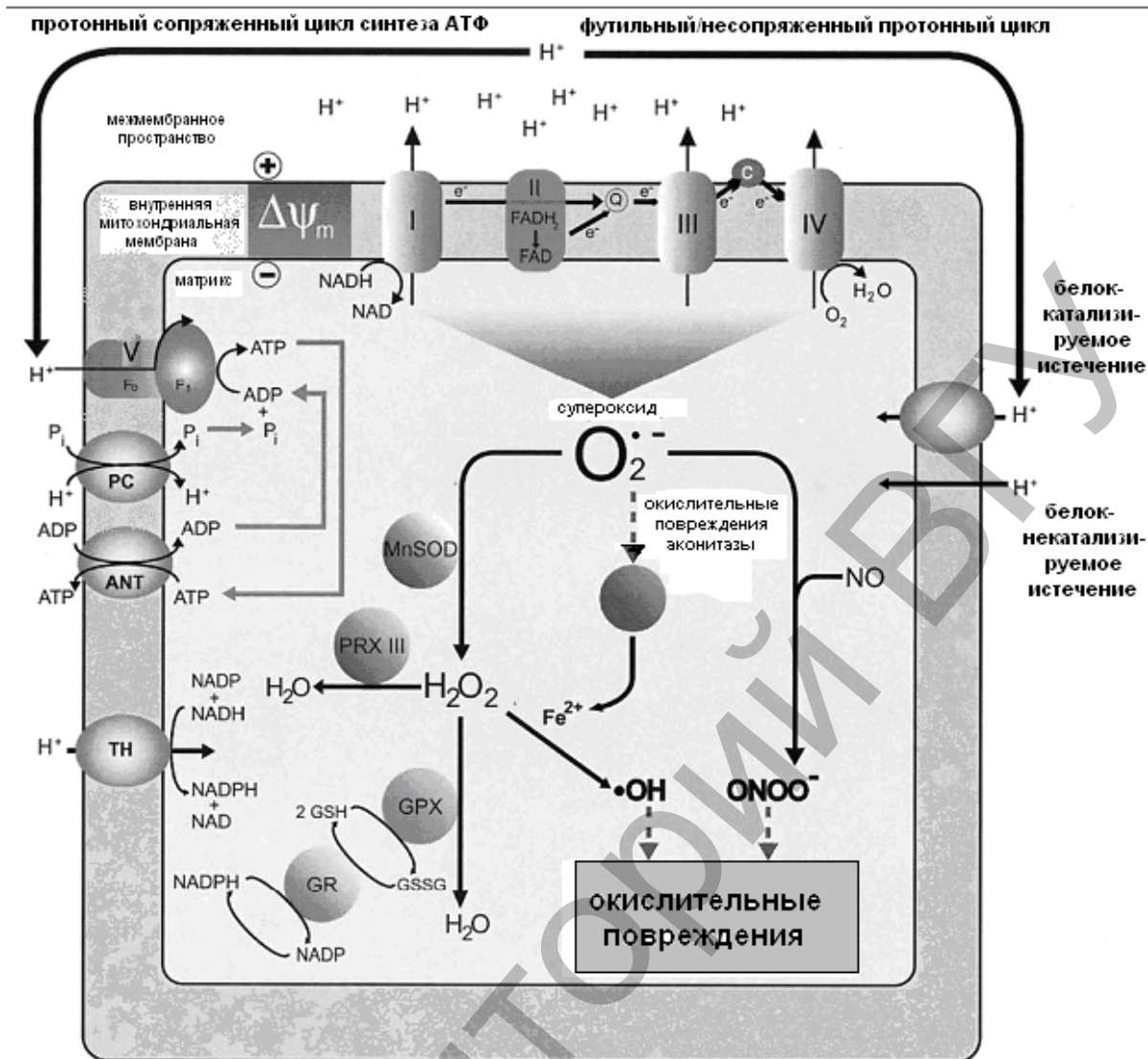


Рис. 5.1. Электронтранспортная цепь и митохондриальные окислительные повреждения.

Примечание: митохондриальная дыхательная цепь передает электроны от электронных «челноков» (НАДН (NADH) и ФАДН₂ (FADH₂)) к кислороду, что приводит к перекачке протонов из матрикса в межмембранное пространство и формированию протонного электрохимического градиента ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$). $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ используется для обеспечения синтеза АТФ АТФ-синтазой. Обмен АТФ и АДФ катализируется транспортером адениннуклеотидов (ANT, антипортер), а перемещение неорганического фосфата (P_i) – соответствующим переносчиком (PC). Существуют пути истечения протонов $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ без образования АТФ. Дыхательная цепь (комплексы I–III) генерирует O₂^{•-}, который может повреждать железо-серные кластеры белков, таких, как аконитаза, таким образом освобождая ионы железа. O₂^{•-}, реагируя с оксидом азота (NO), вызывает образование высокотоксичного пероксинитрита (ONOO⁻), а в присутствии ионов железа – очень реактивного гидроксильного радикала (HO•). И ONOO⁻, и HO• могут вызвать повреждение митохондриальных липидов, белков и ДНК (основание схемы). Защиту против окислительного повреждения в митохондриальном матриксе обеспечивает Mn-содержащая супероксиддисмутаза (Mn-SOD), глутатионпероксидаза (GPX) и пероксиредоксин (PRX). Глутатионредуктаза (GR) в присутствии НАДФН обеспечивает регенерацию окисленной формы глутатиона (GSSG) в восстановленную (GSH). Часть необходимого НАДФН поставляет трансгидрогеназа (TH).

Основная часть митохондриального O_2^- диффундирует в матрикс, где взаимодействует с внутримитохондриальной MnSOD, которая катализирует реакцию $2O_2^- + 2H^+ \Rightarrow O_2 + H_2O_2$. Стационарные концентрации O_2^- для матрикса митохондрии составляют 0,2–0,3 нМ при содержании 10–40 μ М MnSOD-реакционных центров. O_2^- , диффундирующий в межмембранное пространство, реагирует с цитохромом c, расположенным на внешней стороне внутренней мембраны, и с Cu, Zn-SOD межмембранного пространства.

Глутатионпероксидаза катализирует превращение H_2O_2 и восстановление гидроперекисей ROOH с участием восстановленного глутатиона и является уникальным ферментом, который использует в качестве субстрата H_2O_2 в митохондриях большинства органов млекопитающих, исключением является сердце, где была описана митохондриальная каталаза.

За счет митохондриальной активности глутатионпероксидазы метаболизируется $\approx 60\%$ H_2O_2 , образующегося в митохондрии, что указывает на ее важную роль в детоксикации H_2O_2 и в восстановлении митохондриальных гидроперекисей. Функционирование глутатионпероксидазы требует непрерывной поставки GSH в митохондрии из цитозоля, где осуществляется его синтез. Отдельный фермент, НАДФН-зависимая глутатионредуктаза, расположенная в матриксе митохондрии, находится в высоко активном состоянии и поддерживает отношение GSH/GSSG в высоко восстановленном состоянии (рис. 5.1).

Таким образом, генерация АФК в структурно и функционально интактной митохондрии уравнивается системой антиоксидантной защиты, ограничивающей распространение и биодоступность АФК. Снижение уровня антиоксидантной защиты в митохондриях является предпосылкой для увеличения продукции АФК, развития окислительного стресса и последующей дисфункции митохондрий.

8. Мишени АФК в митохондриях

В обычных условиях низкая стабильность и неспособность АФК проникать через бислой мембранных липидов создают эффективный экран, препятствующий распространению окислительного повреждения. Однако, взаимодействуя с полиненасыщенными жирными кислотами митохондриальных липидов, они образуют гидроперекиси, α -, β -ненасыщенные альдегиды, например, 4-гидрокси-2-ноненаль, которые, обладая высокой электрофильностью, достаточно стабильны, способны распространяться между клеточными компартментами и взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами. Иницируемые АФК цепные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) играют важную роль в патогенезе атеросклероза, по-

вреждений, вызываемых ишемией/реперфузией, в развитии стресс-индуцированного преждевременного старения.

Кислородные радикалы и иные АФК, вызывая окислительную модификацию белков, приводят к изменению их функций, химической фрагментации и повышенной уязвимости к протеолитической атаке, осуществляемой главным образом протеосомами. Митохондриальный фермент аконитаза 2 – одна из важнейших мишеней митохондриального окислительного стресса. Аконитаза 2 (ACO-2) – Fe-S-содержащий белок, катализирующий изомеризацию цитрата в изоцитрат в цикле Кребса. Селективная уязвимость фермента частично объясняется структурной склонностью Fe-S-белка в ACO-2 к формированию АФК и пероксинитрита. Известно, что ACO-2 является специфической мишенью окислительного повреждения в процессе старения. Показано, что длительное экспонирование митохондрий окислителям приводит к разрушению кластера $[4Fe-4S]^{2+}$, карбонилированию и деградации фермента. Взаимосвязь между окислительным стрессом и инактивацией фермента продемонстрирована в процессе повреждения сердечной мышцы при ишемии/реперфузии. Истощение ACO-2 приводит к ингибированию цикла Кребса. При этом избыток пирувата преобразуется в лактат с участием лактатдегидрогеназы, как это имеет место у мышечной с введением L-NMMA. Кроме того, в ингибирование цикла Кребса вносит вклад истощение фермента ECHS-1, который катализирует второй шаг β -окисления жирных кислот в процессе метаболизма, при котором жирные кислоты превращаются в митохондриях и/или пероксисомах в форму ацил-CoA, чтобы затем метаболизировать в ацетил-CoA, включаемый в цикл Кребса. Так, острое воздействие NO сопровождается «метаболической гипоксией» за счет ингибирования митохондриального электронного транспорта. С другой стороны, хроническое разобщение mtNOS вызывает тот же результат через избирательное истощение ACO-2 и ECHS-1. Подобное ингибирование цикла Кребса представляет механизм, объясняющий развитие эндотелиальной дисфункции.

Анионные фосфолипиды ВММ, обогащенные в контактных участках с внешней митохондриальной мембраной кардиолипином, представляют другую главную мишень окислительного стресса. В нормальных условиях кардиолипид «фиксирует» cyt-c в ВММ. Окисление высоконенасыщенных ацильных цепей кардиолипина снижает его сродство к cyt-c и освобождает cyt-c в свободное состояние. Это в сочетании с повышением проницаемости внешней митохондриальной мембраны к проапоптотическим членам семейства белков Bcl-2 приводит к выходу cyt-c в цитозоль, формированию апоптосомы и активации каскада каспаз, достигающей высшей точки при

апоптозе. Примечательно, что в контактные участки внешней митохондриальной мембраны и ВММ также входят гексокиназы II и III, связанные с эндоплазматической стороной потенциал-зависимого анионного канала. Гексокиназы, связанные в этом канале, предотвращают выход цит-с из митохондрии, таким образом создавая антиапоптотический эффект. Это, в свою очередь, поддерживает взаимосвязь внутримитохондриального и экстрамитохондриального метаболизма через эффективный обмен адениннуклеотидов; диссоциация гексокиназ от митохондрии вызывает разобщение митохондриального метаболизма в зависимости от потребности клетки и облегчает апоптоз.

9. Последствия митохондриального окислительного стресса

Роль митохондрии в каспаз-зависимой программируемой клеточной гибели хорошо установлена, тогда как возможность проникновения в суть каспаз-независимых механизмов смерти клетки появилась недавно. Аутофагия – один из защитных механизмов, защищающих клетки от воздействия окислительного стресса – отрегулированный лизосомальный путь, обеспечивающий лизис и восстановление окисленных белков и поврежденных органелл при старении клетки. Накапливаются доказательства, что процессы аутофагии чрезмерно поврежденных органелл, например, пероксисом, эндоплазматической сети и митохондрий, могут включаться в ответ на увеличение продукции АФК. Увеличение образования АФК в покоящейся митохондрии представляет угрозу для этой органеллы и, соответственно, для жизнеспособности клетки, поскольку инициирует открытие каналов митохондриальной мембраны, включая mPTP и анионные каналы внутренней мембраны, что приводит к коллапсу митохондриального мембранного потенциала и дальнейшему транзиторному увеличению генерации АФК ЭТЦ. Эти события могут закончиться аутофагией, апоптозом или некрозом.

Ротенон – ингибитор комплекса I – и теноил трифлуороацетон – ингибитор комплекса II – вызывают в трансформированных линиях опухолевой клетки АФК-опосредованную аутофагию. Эти наблюдения демонстрируют, что ингибирование митохондриальной ЭТЦ может привести к аутофагической смерти раковых, но не других типов клеток, обеспечивая новую потенциальную стратегию для борьбы с опухолевым процессом.

В настоящее время появляются данные о том, что «несмертельный» окислительный стресс может стимулировать митохондриальную биогенетику, в том числе через активацию связывания альфа-аминоизокапроновой кислоты с факторами транскрипции, которые регулируют экспрессию генов для ферментов системы детоксикации ксенобиотиков и антиоксидант-

ной защиты, например, глутатион S-трансферазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы. Этими процессами управляют, по крайней мере, частично митохондриальные АФК. В частности, активация ядерного дыхательного фактора 1 является предпосылкой для активации транскрипции митохондриального фактора А, индукции митохондриальной ДНК (mtDNA) и активации митохондриальной биогенетики.

10. Повреждение митохондрий печени крыс при интоксикации тетрахлорметаном

Молекулярные механизмы повреждения митохондрий и роль митохондриальной дисфункции в патогенезе разнообразных расстройств требуют своего выяснения. Нами проведено исследование по выяснению механизмов повреждения митохондрий печени крыс при острой интоксикации крыс тетрахлорметаном. Одновременно оценили возможность фармакологической коррекции митохондриальных повреждений мелатонином. Параметры, характеризующие состояние окислительной, фосфорилирующей и сопрягающей функций митохондрий клеток печени интактных животных и животных, подвергнутых действию тетрахлорметана и мелатонина (в качестве возможного гепатопротектора), при использовании в качестве субстратов окисления сукцината и L-глутамата (б) существенно изменялись. Через 24 часа после острого токсического поражения печени крыс тетрахлорметаном в дозе 4 г/кг массы животного наблюдали нарушение дыхательной функции митохондрий. Так, скорость сукцинат-зависимого потребления кислорода (V_2) несколько увеличивалась (на 25%), скорость дыхания митохондрий в состоянии 3 (V_3) при использовании сукцината уменьшалась значительно (на 65%, $p < 0,001$). В то же время скорость глутамат-зависимого дыхания (V_2) не изменялась, скорость глутамат-зависимого потребления кислорода, сопряженного с фосфорилированием (V_3), уменьшалась существенно (на 50%, $p < 0,01$) и полностью отсутствовал выход в четвертое метаболическое состояние. Соответственно, коэффициент дыхательного контроля для экзогенных субстратов (сукцината, глутамата) приближался к единице, а коэффициент фосфорилирования резко уменьшался, что отражало снижение эффективности использования кислорода митохондриями при синтезе АТФ. Одновременно наблюдали окисление внутримитохондриального глутатиона (на 25%, $p < 0,05$), рост активности глутатионпероксидазы (на 50%, $p < 0,05$), выраженную инактивацию сукцинатдегидрогеназы (на 35%, $p < 0,01$) и возрастание содержания NO в плазме крови крыс (на 45%, $p < 0,05$). Мы предполагаем, что механизм окислительного повреждения митохондрий при интоксикации может

быть связан с истощением внутримитохондриального глутатиона, окислительной модификацией митохондриальных ферментов, повреждением митохондриальной мембраны.

Учитывая ключевую роль дисфункции митохондрий в патогенезе многих заболеваний, фармакологическую коррекцию дыхательной активности митохондрий следует рассматривать как перспективный подход в современных медицинских технологиях, а компоненты дыхательной цепи – как мишени специфического фармакологического воздействия. Недавно установлено, что гормон эпифиза мелатонин – широко исследуемый антиоксидант, защищает митохондрии при внутримитохондриальной генерации свободных радикалов. Наиболее высокая внутриклеточная концентрация мелатонина обнаружена в митохондриях, что позволяет предположить его непосредственное участие в функционировании этих органелл и модулировании их респираторной активности. В нашем эксперименте ведение мелатонина интоксцированным животным (по 10 мг/кг три раза) сопровождалось увеличением скорости дыхания в состоянии 3 на 30% ($p < 0,05$) (при использовании в качестве субстрата сукцината, но не глутамата), снижало активность глутатионпероксидазы митохондрий до контрольного уровня и предотвращало возрастание уровня оксида азота, но не оказывало протекторного эффекта на процессы сопряжения дыхания и фосфорилирования в митохондриях. Таким образом, мелатонин в дозе 10 мг/кг массы тела существенно не предотвращал нарушения функционального состояния митохондрий печени крыс при тяжелой интоксикации тетрахлорметаном, но оказывал регуляторное воздействие на уровень оксида азота в плазме крови и активность глутатионпероксидазы митохондрий.

11. Некоторые методические подходы к исследованию митохондрий

Для исследования структуры и функции митохондрий и механизмов образования свободных радикалов в митохондриальных компартментах и мембранных структурах используется ряд методических подходов, которые условно можно подразделить на:

1. Препаративные – с помощью которых из клеток различных органов изолируют митохондрии и путем различных воздействий получают митохондриальные фрагменты, выделяют отдельные ферменты и дыхательные комплексы.

2. Морфологические – включающие прежде всего электронную микроскопию изолированных и нативных митохондрий, с помощью которых

исследуется структура митохондриальных мембран, размеры и форма митохондрий.

3. Функциональные – с помощью которых исследуются механизмы потребления кислорода и синтеза АТФ, сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в интактных (изолированных) митохондриях и активность отдельных комплексов дыхательной цепи в митохондриальных фрагментах.

4. Ферментативные – благодаря которым изучается активность отдельных митохондриальных ферментов, полученных из препаратов изолированных митохондрий.

5. Прижизненные – включающие использование различных митохондриальных зондов для оценки физиологии митохондрий в культуре клеток или органов.

6. А также детекция образования свободных радикалов и других АФК в изолированных митохондриях и исследование активности свободнорадикального окисления мембранных липидов, митохондриальных белков и нуклеиновых кислот.

Все используемые подходы базируются на соответствующих биохимических и биофизических методах.

К рутинным, часто используемым в экспериментальной практике методам, которые позволяют оценить функциональное состояние интактных (изолированных) митохондрий, относятся методы регистрации митохондриального дыхания и измерения мембранного потенциала митохондрий. В настоящей работе мы посчитали необходимым более подробно изложить суть этих методов, поскольку они могут быть реализованы практически в любой лаборатории. В качестве лабораторных заданий для студентов мы предлагаем изолировать митохондрии печени крысы, определить параметры митохондриального дыхания и величину мембранного потенциала митохондрий.

Лабораторная работа

Изолирование митохондрий клеток печени (гепатоцитов)

Митохондрии из печени крыс мы изолировали по методу Джонсона и Ларди в холодной комнате при температуре 4 °С. Необходимый инвентарий и используемые растворы (среды) также были охлаждены до температуры 4 °С. После эвтаназии животного печень быстро извлекали из брюшной полости и помещали в стаканчик со средой выделения (50 мл), находящийся в ледяной бане. После охлаждения (в течение 10 мин) печень осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и продавливали через от-

верстия (диаметром 0,5 мм) ручного пресса. Полученную таким образом гомогенную кашицеобразную массу из ткани печени переносили шпателем в стакан гомогенизатора и туда же вносили среду изолирования из расчета 5 мл среды на 1 г массы печени. Среду изолирования, содержащую 0,25 М сахарозы, 0,02 М Трис-НСl, 0,001 М ЭДТА, рН 7,2, готовили с использованием дважды дистиллированной воды. Гомогенизацию ткани печени осуществляли с помощью тефлонового пестика в течение 60 с при 600 об/мин в стеклянном гомогенизаторе Поттера–Эвельгейма, помещенном в ледяную баню. Приготовленные таким образом гомогенаты центрифугировали при 600 g в течение 10 мин при 4 °С для осаждения ядер и обломков клеток. Затем супернатант отделяли от осадка и подвергали центрифугированию при 8500 g в течение 10 мин при 4 °С для осаждения митохондрий. Супернатант вместе с жировым слоем удаляли, а полученный митохондриальный осадок ресуспендировали в таком же объеме среды выделения и повторно центрифугировали при 8500 g в течение 10 мин при 4 °С. После этого митохондрии ресуспендировали в небольшом объеме среды выделения для получения конечной концентрации белка 40–50 мг/мл и хранили на льду. Концентрацию белка определяли по методу Лоури.

Исследование мембранного потенциала митохондрий печени крыс с использованием флуоресцентного зонда сафранина О. Одним из важных показателей функционального состояния митохондрий является мембранный потенциал, представляющий разность потенциалов, которая возникает вследствие переноса протонов на внешнюю сторону внутренней мембраны митохондрий при прохождении электронов через I, III и IV комплексы дыхательной цепи. Благодаря мембранному потенциалу осуществляется связь между процессами окисления субстрата и аккумуляирования образующейся при этом энергии в виде макроэргических связей молекул АТФ. Величина мембранного потенциала в митохондриях определяется не только работой электрон-транспортной цепи, но также проницаемостью внутренней мембраны и процессом синтеза АТФ.

Для измерения величины трансмембранного потенциала митохондрий регистрируем интенсивность флуоресценции катионного липофильного зонда сафранина О ($\lambda_{ex} = 495$ нм, $\lambda_{em} = 586$ нм), встроенного в мембрану. Как известно, наличие разности электрических потенциалов на митохондриальной мембране («-» на внутренней стороне) приводит к аккумуляированию сафранина О внутри органелл. Создаваемая благодаря этому высокая локальная внутримитохондриальная концентрация зонда приводит к его димеризации и уменьшению интенсивности флуоресценции. Степень ту-

шения флуоресценции определяется с помощью спектрофлуориметров, в нашем случае с помощью спектрофлуориметра СМ 2203.

Процедура измерения мембранного потенциала заключалась в следующем: суспензию митохондрий (0,3 мг белка/мл) мы инкубировали при температуре 27 °С в среде, содержащей 0,125 М сахарозы, 0,02 М Трис-НCl, 0,05 М KCl, 0,02 М KH_2PO_4 , 0,005 М MgSO_4 , 0,001 М EDTA, pH 7,5 (могут использоваться и другие среды дыхания), в присутствии 8 мкМ флуоресцентного зонда сафранина О. При использовании L-глутамата или α -кетоглутарата (5 мМ) в качестве субстратов дыхания происходит генерация мембранного потенциала благодаря активности I, III и IV комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий. Мембранный потенциал, отражающий активность комплексов II, III и IV формируется при использовании в качестве субстрата сукцината (5 мМ) в присутствии блокатора I комплекса – ротенона (40 мкМ). Интенсивность флуоресцентного зонда в суспензии митохондрий отражает величину митохондриального мембранного потенциала, т.е. степень истечения зонда из митохондрий. Внесение в суспензию митохондрий субстратов (глутамата, α -кетоглутарата, сукцината) приводит к тушению флуоресценции зонда сафранина О, что связано с формированием электрического потенциала на внутренней мембране митохондрий. Для получения максимальной интенсивности флуоресцентного сигнала зонда в суспензии митохондрий (для калибровки интенсивности флуоресцентного зонда от величины мембранного потенциала) мы использовали протонофор 2,4-динитрофенол (36 мкМ) и блокатор цитохромоксидазы – азид натрия (5 мМ), полностью деполяризующие митохондриальную мембрану (рис. 5.2).

Генерируемый дыхательной цепью митохондрий электрохимический мембранный потенциал включает в себя как электрическую, так и химическую составляющую. Так как присутствие ионов фосфата в реакционной среде приводит к конверсии $\Delta p\text{H}$ в электрический потенциал и вклад $\Delta p\text{H}$ в электрохимический потенциал становится относительно малым по сравнению с электрической составляющей, то компонентом $\Delta p\text{H}$ на внутренней мембране митохондрий в данном случае можно пренебречь. Количественные значения мембранного потенциала митохондрий определяли с помощью калибровочного графика, представляющего зависимость интенсивности флуоресценции зонда от величины мембранного потенциала. Построение калибровочного графика выполняли с использованием уравнения Нернста для расчета калиевого диффузионного потенциала митохондрий

$$\Delta\psi = 60 \lg [\text{K}^+]_{\text{внешн}} / [\text{K}^+]_{\text{внутр}},$$

где внутримитохондриальную концентрацию ионов калия $[K^+]_{\text{внутр}}$ принимали равной 125 мМ, $[K^+]_{\text{внешн}}$ – концентрация ионов калия в среде. Для построения калибровочного графика митохондрии (0,3 мг белка/мл) ресуспендировали в среде, содержащей 0,2 М сахарозы, 2,5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ EDTA, 0,02 М Трис-НСl (рН 7,5) и 8 мкМ сафранина О (рис. 5.3).

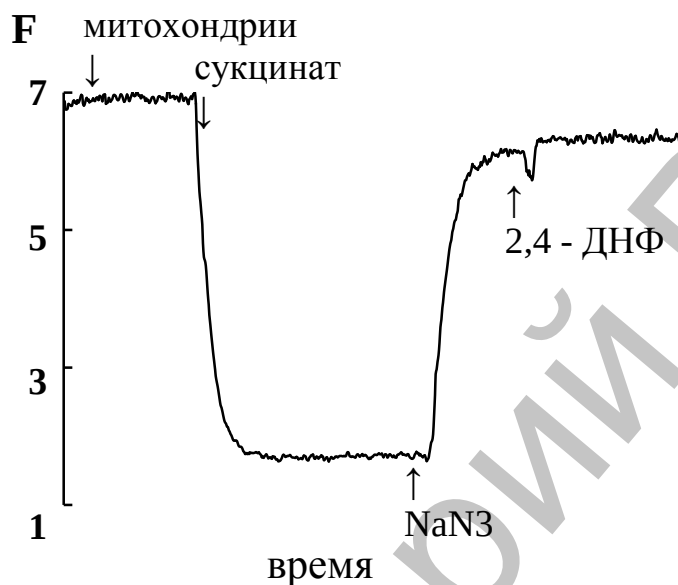


Рис. 5.2. Интенсивность флуоресценции зонда сафранина О в присутствии митохондрий печени крыс.

Примечание: концентрация белка в суспензии митохондрий – 0,3 мг белка/мл. Среда измерения мембранного потенциала: 0,125 М сахароза, 0,02 М Трис-НСl, 0,05 М KCl, 0,02 М KH_2PO_4 , 0,005 М $MgSO_4$, 0,001 М ЭДТА, рН 7,5 в присутствии зонда (8 мкМ). Стрелками указано последовательное внесение компонентов в среду измерения.

Для получения промежуточных значений мембранного потенциала изменяли внешнюю концентрацию ионов калия (в диапазоне 0–20 мМ) в присутствии ионофора валиномицина (0,28 мкМ), который приводил в случае энергизованных митохондрий (добавление 5 мМ сукцината) к переносу ионов калия внутрь митохондрий, уменьшению разности потенциалов и истечению сафранина О из органелл (рис. 5.3). Известно, что линейная зависимость интенсивности флуоресценции используемого нами зонда – сафранина О – от величины мембранного потенциала сохраняется в широком диапазоне значений мембранного потенциала.

Величина мембранного потенциала митохондрий печени крыс, определяемая нами по калибровочному графику с использованием сафранина О, соответствует значениям, измеренным ранее другими методами.

Исследование респираторной активности изолированных митохондрий клеток печени с помощью полярографического метода. Для реализации данного метода используются кислородные электроды и полярографические ячейки различных типов, которые могут быть изготовлены и в лабораторных условиях.

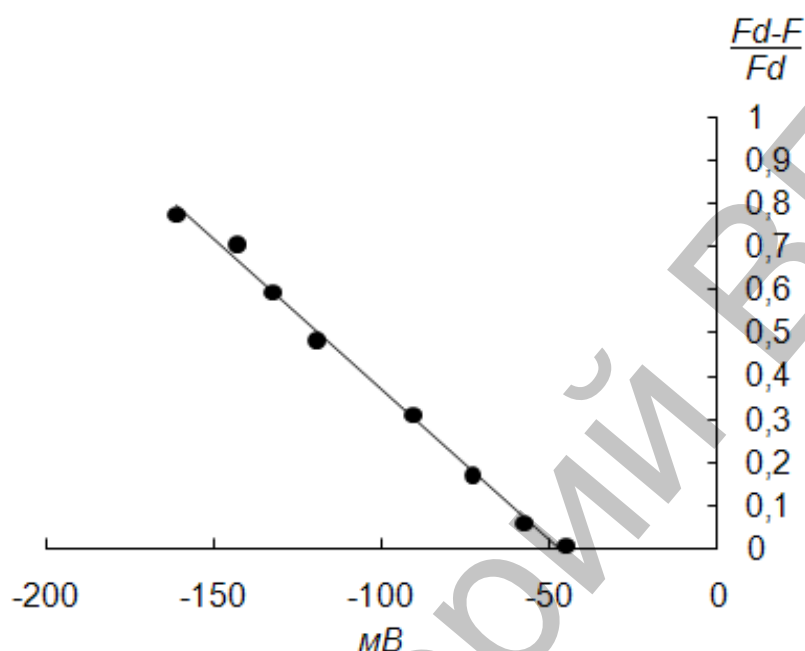


Рис. 5.3. Зависимость интенсивности флуоресценции зонда сафранина О в суспензии митохондрий от величины диффузионного K^+ -зависимого потенциала.

Примечание: F – интенсивность флуоресценции зонда в присутствии митохондрий; F_d – интенсивность флуоресценции зонда в присутствии митохондрий и 2,4-динитрофенола. Концентрация белка в суспензии митохондрий – 0,3 мг белка/мл. Среда измерения мембранного потенциала: 0,2 М сахараза, 2,5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ ЭДТА, 0,02 М Трис-НCl, 8 мкМ сафранин О, 5 мМ сукцинат натрия, 0,28 мкМ валиномицин (рН 7,5). Изменение внемитохондриальной концентрации ионов калия (в диапазоне 0–20 мМ) в присутствии ионофора валиномицина приводит в случае энергизованных митохондрий к уменьшению мембранного потенциала и повышению интенсивности флуоресценции зонда.

На рис. 5.4 приведена схема сконструированной нами термостатируемой герметической полярографической ячейки с кислородным электродом типа Кларка. Последний состоит из платинового катода и серебряного анода, погруженных в один и тот же раствор концентрированного хлористого калия и отделенных от исследуемого раствора проницаемой для кислорода мембраной. Селективно проницаемая для кислорода мембрана (тефлон или другой материал) защищает электроды от загрязнения биологическим материалом или химическими агентами, таким образом устраняя один из важных недостатков открытых электродов. С целью уменьшения

инерционности устройства диффузионное расстояние для O_2 между мембраной и платиновым электродом должно было максимально уменьшено.

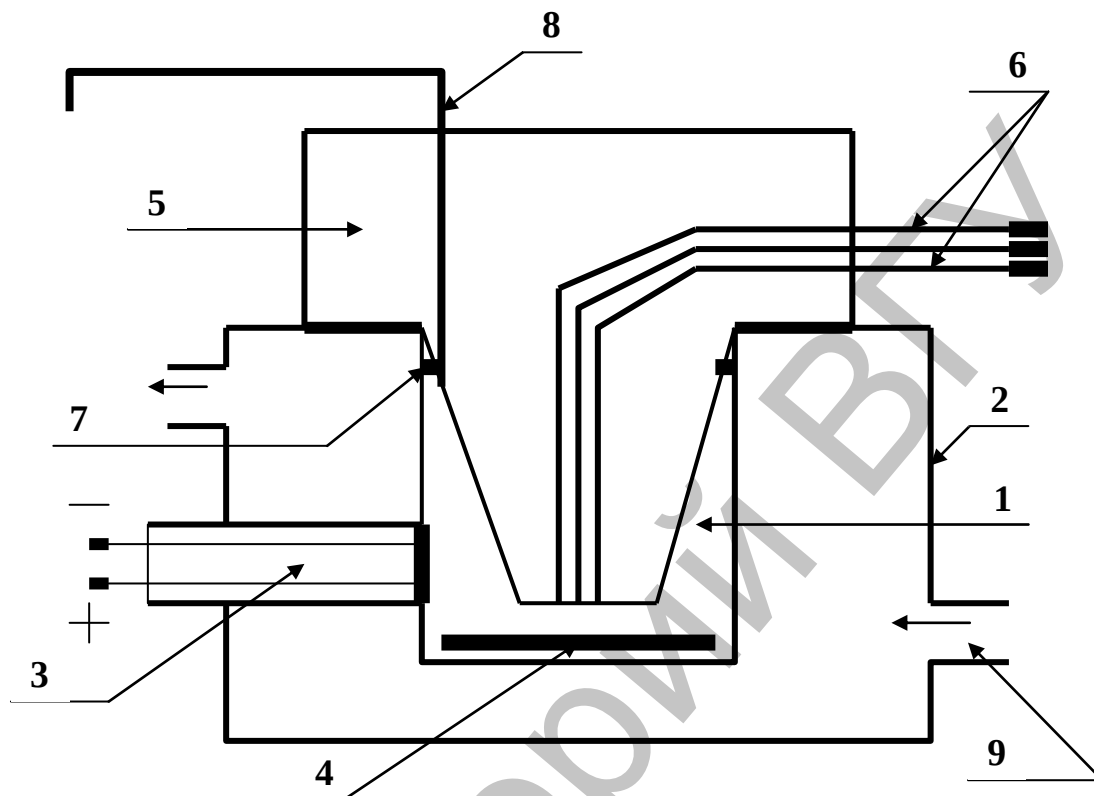
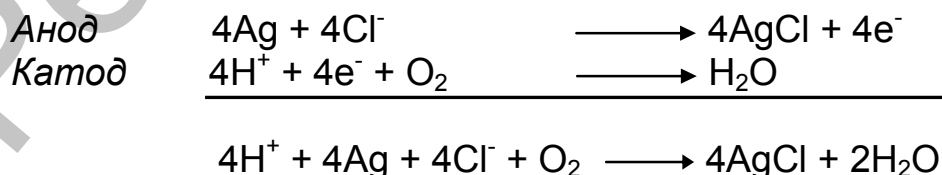


Рис. 5.4. Полярграфическая ячейка для исследования респираторной активности митохондрий.

1 – ячейка; 2 – термостатируемая камера; 3 – электрод Кларка; 4 – магнитная мешалка; 5 – модифицированная пробка; 6 – каналы для дозированного анаэробного введения субстратов и АДФ; 7 – уплотнительное кольцо; 8 – канал для выведения воздуха и жидкости; 9 – штуцер для подключения к ульотермостату.

Принцип кислородной полярграфии основан на электролитическом восстановлении O_2 на платиновом электроде (катоде). Когда платиновый электрод используют в сочетании с хлорсеребряным (анодом), на аноде образуются четыре электрона, которые на катоде расходуются на восстановление одной молекулы кислорода.



В случае, когда напряжение на электродах составляет (0,5–0,8) В, сила возникающего при этом тока прямо пропорциональна концентрации кислорода в суспензии митохондрий.

Регистрация изменений напряжения кислорода (pO_2) в суспензии митохондрий осуществляется с помощью электронных регистраторов (потенциометров) или же, в случае использования адаптеров с встроенным аналогово-цифровым преобразователем, непосредственно на персональном компьютере. Калибровка электрода Кларка проводится в течение эксперимента путем последовательного продувания через ячейку воздуха (pO_2 воздуха) и газообразного азота ($pO_2=0$ мм рт. ст.) или же путем добавления в раствор, находящийся в ячейке, небольших количеств порошкообразного сульфита натрия, связывающего растворенный кислород. Процедура исследования респираторной активности митохондрий включала следующие этапы: в ячейку вносили 3,0 мл среды инкубации и 0,1 мл концентрированной суспензии митохондрий, которые перемешивали с помощью магнитной мешалки. После этого ячейку закрывали модифицированной пробкой, вытесняя при этом воздух и избыточное количество суспензии, уменьшая при этом объем ячейки до 1,75 мл. Конструкция ячейки позволяет в анаэробных условиях вводить в суспензию через специальные каналы субстраты, АДФ и другие эффекторы (рис. 5.4).

Реактивы. Все реактивы, используемые для приготовления среды инкубации митохондрий, должны иметь срок годности и квалификацию «ОСЧ» или «ЧДА». При необходимости они могут быть подвергнуты дополнительной очистке. Среда инкубации должна удовлетворять нескольким принципиальным условиям – быть изотоничной и изоосмотичной со средой матрикса, не должна содержать повреждающих примесей (соли тяжелых металлов и др.). Гипоосмотичная среда приводит к набуханию митохондрий, гиперосмотичная – к их сморщиванию, что в конечном итоге нарушает респираторную активность органелл. Наиболее важными компонентами среды дыхания являются: KCl (генерация мембранного потенциала), H_3PO_4 (для процесса фосфорилирования АДФ), маннитол или сахароза (для создания оптимального осмотического давления). Составы сред инкубации для митохондрий, полученных из разных тканей, несколько отличаются по составу и приводятся в ряде руководств. В зависимости от поставленной задачи (исследование дыхания, активности ферментов, набухания митохондрий и пр.) подбирается и соответствующий состав среды для инкубации. Вода для приготовления среды дыхания должна быть максимально очищена (дважды дистиллирована и деионизирована).

Ниже мы приводим состав среды инкубации для исследования респираторной активности изолированных митохондрий печени крысы: 0,125 М сахароза, 0,02 М Трис-HCl, 0,05 М KCl, 0,0025 М KH_2PO_4 , 0,005 М $MgSO_4$, 0,005 М EDTA, pH 7,5. Следует отметить, что содержание компонентов в

среде может варьировать в определенных пределах (в зависимости от степени очистки воды и решаемой задачи). Температура среды для исследования дыхания митохондрий не должна превышать 30 °С.

Регистрация респираторной активности митохондрий печени крысы и оценка результатов. Калибровка электрода. Электрод Кларка, расположенный в полярографической ячейке, перед каждым исследованием калибруется. Для этого через канал 8 полярографической ячейки (рис. 5.4), не содержащей жидкости, подается газообразный азот, который выходит из ячейки через каналы 6. Продувка ячейки газообразным азотом приводит к удалению кислорода из ячейки и падению его содержания (сO_2) до нулевого значения, которое регистрируется электродом Кларка. При этом на ленте регистратора (в случае использования самописца для регистрации процесса дыхания) записывается калибровочный сигнал (рис. 5.5а), амплитуда которого измеряется в миллиметрах. Разделив $\Delta \text{сO}_2$ (которое при 25 °С составляет 470 нг ат О) на амплитуду калибровочного сигнала в миллиметрах мы получаем количество нг ат О на 1 мм смещения пера регистратора.

После калибровки электрода в ячейку вносим среду инкубации в определенном объеме (в наших условиях 3,0 мл), а затем добавляется 0,05–0,1 мл концентрированной суспензии митохондрий с содержанием белка 35–45 мг/мл. Конечная концентрация белка в суспензии митохондрий в ячейке должна составлять ~ 1,0 мг/мл определенного объема митохондриальной суспензии (в ячейке остается только строго заданное количество суспензии без воздуха).

После этого ячейка закрывается специальной пробкой, что приводит к удалению из ячейки воздуха, и одновременно с этим осуществляем регистрацию количества поглощаемого митохондриями кислорода. На рис. 5.5б представлена классическая кривая, отражающая метаболические состояния митохондрий (1–4) с соответствующими скоростями потребления кислорода митохондриями.

Рассчитывали скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях. Как видно из представленной кривой, после внесения в ячейку митохондрий наблюдается поглощение кислорода со скоростью V_1 . Это скорость базального (эндогенного) дыхания. После введения в суспензию митохондрий субстрата (сукцината, малата/глутамата и др.) скорость поглощения кислорода возрастает и регистрируется скорость субстрат-стимулируемого дыхания V_2 . Следует отметить, что конечная концентрация субстрата в ячейке не должна лимитировать скорость митохондриального дыхания, что составляет примерно 5 мМ. После этого в ячейку

добавляли АДФ и регистрировали скорость АДФ-стимулируемого дыхания V_3 (скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием). После фосфорилирования внесенного АДФ дыхание митохондрий замедляется, и регистрируется скорость V_4 , которая примерно соответствует по величине скорости V_2 .

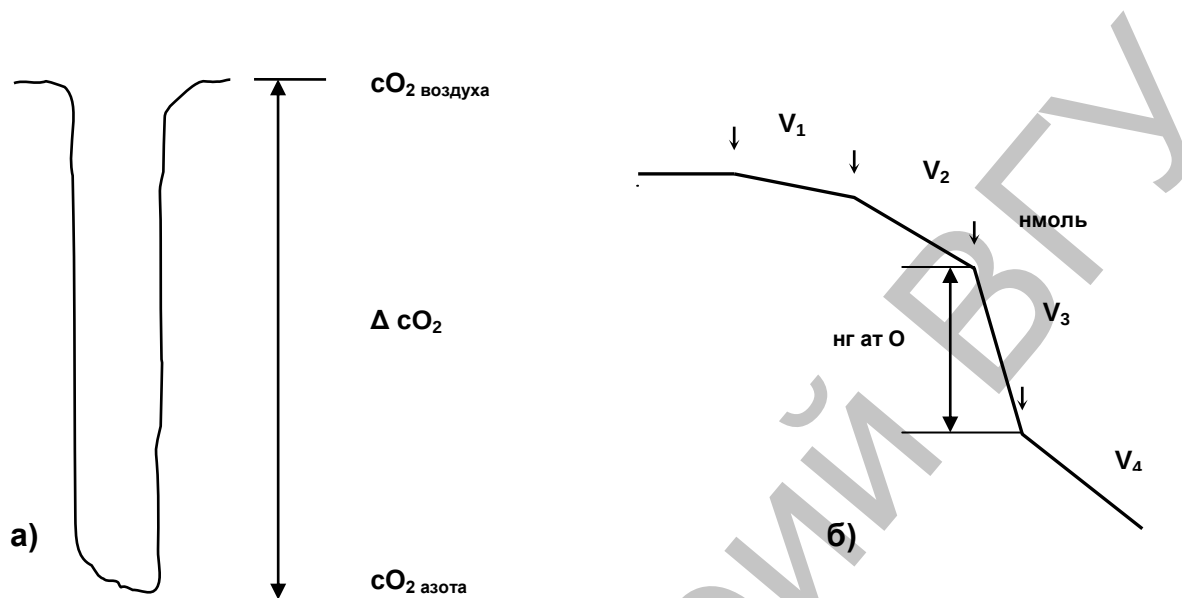


Рис. 5.5. Калибровочный график (а) и кривая поглощения кислорода (б) изолированными митохондриями печени крысы.

Примечание: на рисунке 5.5 в части а: cO_2 воздуха – содержание кислорода в воздухе (или растворе при pO_2 воздуха), cO_2 азота – содержание кислорода в газообразном азоте, принимаемое равным нулю; в части б стрелками слева направо обозначены моменты внесения в ячейку суспензии митохондрий, субстрата и АДФ и выход дыхания в четвертое метаболическое состояние соответственно.

Зная скорости поглощения кислорода в метаболических состояниях 2, 3, 4, можно рассчитать параметры, характеризующие сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях: коэффициенты акцепторного контроля (V_3/V_2) и дыхательного контроля (V_3/V_4). Коэффициент фосфорилирования рассчитывается путем деления количества внесенного ADP на количество поглощенного кислорода в 3-м метаболическом состоянии (рис. 5.5б).

Исследование набухания митохондрий. Набухание изолированных митохондрий индуцируется открытием mPTP путем внесения в суспензию митохондрий ионов Ca^{2+} , что приводит к установлению равновесия осмотиков по обе стороны внутренней митохондриальной мембраны и как следствие – к увеличению объема органелл, величина которого пропорциональна доле митохондрий с открытыми mPTP. Исследование набухания

митохондрий проводили, регистрируя интенсивность светорассеяния суспензии митохондрий по изменению величины абсорбции при длине волны 540 нм (использовали спектрофотометр Cary Varian 100) при 25 °С. Изменения объема митохондрий (осмотическое набухание) измеряли в среде, содержащей 0,2 моля сахараза, 0,02 моля Трис-НCl, 0,001 моля K_2HPO_4 , 2 мкмоля ротенона, 0,005 моля сукцината, pH 7,4. Концентрация митохондриального белка в пробе составляла 1 мг/мл. Добавление 30 мкмольей Ca^{2+} приводило к открытию неспецифических мембранных пор митохондрий, что сопровождалось набуханием митохондрий, регистрируемым по убыванию величины абсорбции.

Митохондриальное дыхание – основной процесс превращения энергии в эукариотических клетках. Пять ферментов, локализованных во внутренней митохондриальной мембране, составляют систему окислительного фосфорилирования (OXPHOS). Четыре из пяти белковых комплексов составляют «дыхательную цепь» и участвуют в переносе электронов, который в трех пунктах сопряжен с транслокацией протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Результирующий протонный градиент используется АТФ-синтазным комплексом для фосфорилирования ADP. Комплекс I, или НАДН дегидрогеназа, является основной точкой входа электронов в дыхательную цепь. Комплекс II, или сукцинатдегидрогеназа, представляет другую точку входа электронов в дыхательную цепь, которая передает электроны с сукцината на убихинон и непосредственно связывает цикл Кребса с дыхательной цепью. Этот электронный перенос не связан с транслокацией протонов через мембрану. Центральным компонентом системы OXPHOS является цитохром *c* редуктаза или комплекс III, функционирующий в виде димера. Он транспортирует электроны с восстановленного убихинона (убихинол) на цитохром *c*, малый мобильный переносчик электронов, связанный с внешней поверхностью внутренней мембраны. Комплекс IV, или цитохром *c* оксидаза, представляет конечный комплекс дыхательной цепи и описывается как мономер при солубилизации внутренней митохондриальной мембраны мягкими детергентами, но в белковых кристаллах образует димер. Цитохром *c* оксидаза катализирует перенос электронов с цитохрома *c* на молекулярный кислород, восстанавливая последний до воды. Формируемый на ВММ протонный градиент используется АТФ-синтазой (комплекс V) для синтеза АТФ.

В течение долгого времени использовалась свободно-диффузионная модель («fluid-state») для описания организации OXPHOS системы. Согласно этой модели комплексы респираторной цепи свободно диффунди-

руют в мембране и перенос электронов происходит в результате случайных хаотических соударений. Эта модель основана на том, что все индивидуальные белковые комплексы системы OXPHOS могут быть изолированы с сохранением ферментативной активности.

В последнее десятилетие появляется все больше доказательств, которые указывают на стабильные взаимодействия OXPHOS комплексов в форме суперкомплексов: 1) эксперименты, указывающие на точный контроль метаболических потоков, доказывают, что респираторная цепь представляет собой одну функциональную единицу, 2) точечные мутации генов, кодирующих субъединицы одного OXPHOS комплекса, влияют на стабильность другого комплекса OXPHOS, 3) суперкомплексы можно разделить с помощью нативного электрофореза (PAGE), 4) методом электронной микроскопии можно выявить тонкие взаимодействия OXPHOS комплексов в дыхательных суперкомплексах. Предполагают, что OXPHOS суперкомплексы и единичные комплексы OXPHOS сосуществуют во внутренней митохондриальной мембране. Более того, ассоциация OXPHOS комплексов в суперкомплексы и диссоциация суперкомплексов на OXPHOS комплексы, как полагают, является динамическим процессом, который зависит от функционального состояния клетки. Заметим, что комплекс II никогда не входит в суперкомплексы, как показывают данные нативного электрофореза или электронной микроскопии. Димеризация АТФ-синтазы существенна для морфологии крист. Последние исследования митохондрий быка и крысы показывают, что АТФ-синтаза в митохондриальных мембранах организована в длинные ленты димеров. Кристы митохондрий действуют как ловушки (traps) протонов, и АТР-синтаза может оптимизировать свою активность при недостатке протонов.

В митохондриях млекопитающих почти весь комплекс I ассоциирован с комплексом III, частично комплекс IV входит в состав суперкомплекса I–III–IV. Возможные преимущества данного комплекса: каналирование (channeling), непосредственная доставка субстратов (сокращение времени диффузии интермедиатов, хинонов и цитохрома *c*), выраженный рост каталитической эффективности, ограничение образования реактивных интермедиатов, АФК, ускорение реакций внутримолекулярного переноса группировок. Это позволяет направлять интермедиат реакции к определенному ферменту без диффузии в среду. Главное преимущество substrate channeling – это использование локализованных молекул субстрата, что делает реакцию независимой от свойств среды. Полученные данные по взаимодействию комплексов митохондрий быка позволили представить модель сети комплексов респираторной цепи, получившей название респирасомы

(respirasome). Эта модель предполагает, что на две копии больших I_1 – III_2 – IV_4 блоков приходится одна копия малых III_2 – IV_4 блоков.

Супероксиданион-радикалы, генерируемые митохондриальной респираторной цепью, представляют основной источник окислительных повреждений в клетке, которые могут явиться в свою очередь важнейшей причиной нейродегенеративных расстройств, диабетических осложнений, старения. Образование свободных радикалов митохондриями зависит от величины митохондриальной протон-движущей силы. Мягкое разобщение, использование внутримитохондриальных антиоксидантов представляет перспективный терапевтический подход для коррекции многих патологических состояний.

Контрольные вопросы

1. Какие структуры клетки относятся к энергопреобразующим мембранам?
2. Охарактеризуйте структурно-функциональную организацию митохондрий.
3. Назовите и охарактеризуйте компоненты митохондриальной дыхательной цепи и дыхательные комплексы.
4. Как формируется и какую функциональную роль играет митохондриальный электрохимический потенциал?
5. Как функционирует и какую роль выполняет митохондриальный дыхательный комплекс V?
6. Как осуществляется митохондриальная секвестрация Ca^{2+} ?
7. Охарактеризуйте митохондриальные поры высокой проницаемости.
8. В каких митохондриальных биохимических процессах образуются активные метаболиты кислорода?
9. Назовите компоненты митохондриальной антиоксидантной защиты.
10. Каков механизм образования NO в митохондриях?
11. Каковы превращения АМК и каковы их мишени?
12. Как тетрахлорметан участвует в свободнорадикальных митохондриальных процессах?
13. Опишите методику исследования мембранного потенциала митохондрий печени крыс с использованием флуоресцентного зонда сафранина O.
14. Как исследуется респираторная активность изолированных митохондрий клеток печени с помощью полярографического метода?
15. Как оценивается набухание митохондрий?

Литература

1. Duchen, M.R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology / M.R. Duchen // *Mol. Aspects Med.* – 2004. – Vol. 25. – P. 365–451.
2. Скулачев, В.П. Энергетика биологических мембран / В.П. Скулачев. – М.: Наука, 1989. – 564 с.
3. Mitchell, P. Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria / P. Mitchell, J. Moyle // *Nature*. – 1965. – Vol. 208. – P. 147–151.
4. Green, D.E. On the enzymic mechanism of oxidative phosphorylation / D.E. Green, Z.H. Vande // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1982. – Vol. 79. – P. 1064–1068.
5. Chance, B. The respiratory chain and oxidative phosphorylation / B. Chance, G.R. Williams // *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* – 1956. – Vol. 17. – P. 65–134.
6. Kinetic model for Ca^{2+} -induced permeability transition in energized liver mitochondria discriminates between inhibitor mechanisms / S.V. Baranov [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 665–676.
7. Desagher, S. Mitochondria as the central control point of apoptosis / S. Desagher, J.C. Martinou // *Trends Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 369–377.
8. Superoxide flashes in single mitochondria / W. Wang [et. al.] // *Cell*. – 2008. – Vol. 134. – P. 279 – 290.
9. Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria / S. Gao [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 15968–15974.
10. Turrens, J.F. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria / J.F. Turrens, A. Boveris // *Biochem. J.* – 1980. – Vol. 191. – P. 421–427.
11. Boveris, A. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone / Boveris A., Cadenas E. // *IUBMB Life*. – 2000. – Vol. 50. – P. 245–250.
12. Brown, G.C. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols / G.C. Brown, V. Borutaite // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2004. – Vol. 1658. – P. 44–49.

13. The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial dysfunction: proteomic approach / F. Addabbo [et. al.] // *Am J. Pathol.* – 2009. – Vol. 174. – P. 34–43.
14. Brookes, PS. Mitochondrial nitric oxide synthase / P.S. Brookes // *Mitochondrion.* – 2004. – Vol. 3. – P. 187–204.
15. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection / A.J. Kanai [et. al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 14126–14131.
16. Antunes, F. On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide / F. Antunes, A. Boveris, E. Cadenas // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 16774–16779.
17. Valdez, L.B. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity / L.B. Valdez, T. Zaobornyj, A. Boveris // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757. – P. 166–172.
18. Maher, P. Redox control of neural function: background, mechanisms, and significance / P. Maher // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2006. – Vol. 8. – P. 1941–1970.
19. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis / K. Nomura [et. al.] // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 351. – P. 183–193.
20. Green, K. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes / K. Green, M.D. Brand, M.P. Murphy // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53. – Suppl. 1. – S110–S118.
21. Sano, M. Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis / M. Sano, K. Fukuda // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 103. – P. 1191–1193.
22. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation / V. Tortora [et. al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42. – P. 1075–1088.
23. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species / Y. Chen [et. al.] // *J. Cell. Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 4155–4166.
24. Максимчик, Ю.З. Повреждение митохондрий печени крыс при интоксикации тетрахлорметаном. Эффекты мелатонина / Ю.З. Максимчик [и др.] // *Биологические мембраны.* – 2010. – Т. 27, № 3. – С. 262–271.
25. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans / R.J. Reiter [et. al.] // *Acta Biochim. Pol.* – 2003. – Vol. 50. – P. 1129–1146.

26. Johnson, D. Isolation of liver and kidney mitochondria / D. Johnson, H.A. Lardy // *Meth Enzymol.*, Estabrook, R., Pullman, M. (Eds). – Academic Press, N.Y.–London. – 1967. – Vol. 10. – P. 94–101.
27. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
28. Akerman, K.E. Effects of ionophores and metabolic inhibitors on the mitochondrial membrane potential within isolated hepatocytes as measured with the safranine method / K.E. Akerman, J.O Järvisalo // *Biochem. J.* – 1980. – Vol. 192. – P. 183–190.
29. Akerman, K.E. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential / K.E. Akerman, K.F. Wikström // *FEBS Lett.* – 1976. – Vol. 68. – P. 191–197.
30. Практикум по биохимии / С.Е. Северин [и др.]; под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. – М.: МГУ, 1989. – 508 с.
31. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents / V. Petronilli [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 16638–16642.
32. Schagger, H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria / H. Schagger, K. Pfeiffer // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19. – P. 1777–1783.

ГЛАВА 6. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АПОПТОЗА

У многоклеточных организмов – животных, растений и грибов – генетически заложена программа гибели клеток. Формообразовательные процессы в онтогенезе, позитивная и негативная селекция Т- и В-лимфоцитов у животных, гиперчувствительный ответ растений на вторжение патогена, осенний листопад – лишь несколько примеров программируемой клеточной смерти. Программируемая клеточная смерть способствует сохранению порядка и нормального функционирования биологической системы, очищая от не востребуемых, больных, закончивших свой жизненный цикл или появившихся в результате мутаций потенциально опасных клеток.

Клеточная смерть известна с момента открытия самой клетки, еще с 1665 г., когда Р. Гук (R. Hooke) описал формации коры дуба из погибших клеток. Однако долгое время это наблюдение оставалось без внимания. Первые гистологические описания клеточной смерти опубликовали К. Фогт (C. Vogt) в 1842 г. и Р. Вирхов (R. Virchow) в 1859 г. В формировании современных представлений о программируемой клеточной смерти важное место занимает работа Kerr et. al. (1972) о существовании двух различных видов клеточной смерти у животных – апоптоза и некроза.

1. Виды клеточной смерти

Некроз – это патологический процесс, выражающийся в местной гибели ткани в живом организме в результате экзо- (внешнего) или эндогенного (внутреннего) ее повреждения (инфекция, химическое воздействие, облучение, недостаточное кровоснабжение и т.д.). Некроз проявляется в набухании, денатурации и коагуляции (слипанию) цитоплазматических белков, разрушении клеточных органелл и всей клетки. При некрозе происходит выход лизосомальных ферментов из *лизосом*, которые переваривают содержимое клетки, клетка набухает и лопается. Содержимое клетки выбрасывается во внеклеточную среду и развивается воспаление.

Апоптоз – одна из форм программируемой гибели клетки, в результате которой происходит сморщивание цитоплазматической мембраны, уменьшение объема клетки, конденсация хроматина по периферии ядра, фрагментация ДНК, распад ядра на части, распад клеток на везикулы (пузырьки) с внутриклеточным содержимым (апоптотические тельца), которые фагоцитируются соседними клетками или макрофагами. Клетка на данном этапе еще живая (включение летального красителя трипанового

синего не происходит). Видимо, в этом и есть задача апоптоза – утилизация еще живых апоптотических телец, пока содержимое клетки не попало во внеклеточную среду, для предупреждения воспалительных явлений. Т.е. уничтожение клеток путем апоптоза обеспечивает минимальное повреждение тканей по сравнению с другими механизмами смерти. Подобно митозу, апоптоз является нормальным клеточным феноменом, регулирующим число клеток тканей взрослого организма (митоз вызывает репликацию клеток, гиперплазию и гипертрофию, апоптоз – потерю клеток, гипоплазию и атрофию органа). Сравнительная характеристика некроза и апоптоза представлена в табл. 6.1.

Таблица 6.1 – Сравнительная характеристика апоптоза и некроза

Показатель	Апоптоз	Некроз
1	2	3
Причинный фактор	Физиологический или патологический	Патологический
Распространение	Единичные клетки	Группы клеток
Обратимость процесса	Не обратим (после морфологических изменений)	Обратим (в зависимости от стадии)
Скорость развития	1–12 ч	В течение 1 ч
Причина гибели клетки	Деграция ДНК, нарушение функционирования генов, энергетики клетки	Нарушение целостности мембраны
Локализация первичного повреждения	Обычно в ядре	Обычно в мембране клетки
Морфологические признаки		
Изменение размера клетки	Уменьшение (сморщивание)	Увеличение (набухание)
Изменение ядра	Конгломераты хроматина, прилежащие к мембране, пикноз, фрагментация (karyorrhexis)	Набухание, исчезновение (karyolysis, pyknosis, karyorrhexis)
Изменение в цитоплазме	Конденсация цитоплазмы, уплотнение гранул	Лизис гранул, разрыв их мембран
Изменение мембраны	Потеря микроворсинок, образование пузырей, потеря контактов с другими клетками	Нарушение целостности
Органеллы	Интактны	Разрушение

1	2	3
Биохимические признаки ДНК	Фрагментация с образованием крупных (50–300 т.п.н.), а затем мелких (180 п.н.) фрагментов («лестница» при электрофорезе)	Неупорядоченная деградация (размазанное пятно при электрофорезе)
Зависимость от синтеза макромолекул	Обычно зависит от синтеза РНК и белка	Не зависит
Энергозависимость	Зависит	Не зависит
Высвобождение лизосомальных ферментов	Отсутствует	Присутствует
Воспалительная реакция	Отсутствует	Присутствует
Фагоцитоз другими клетками	Присутствует	Отсутствует
Образование рубца на месте процесса	Не происходит	Происходит
Регуляция	Регулируется	Не регулируется

Существуют и другие формы программируемой гибели, например, **аутофагия**. Процесс аутофагии заключается в том, что органеллы соединяются с лизосомами, где перевариваются лизосомальными ферментами. Затем остатки клетки поглощают макрофаги.

Форма клеточной гибели – по пути апоптоза или некроза – во многом определяется внутриклеточной концентрацией НАД⁺ и АТФ. Снижение уровня НАД⁺ и АТФ ведет к индукции некроза.

2. Регуляторы апоптоза

Факторы, влияющие на апоптоз, делятся на индукторы (стимулируют) и ингибиторы (подавляют).

Индукторами апоптоза являются: 1) физиологические активаторы (семейство фактора некроза опухоли (TNF) – Fas лиганды, TNF; трансформирующий ростовой фактор β (TGF- β); нейромедиаторы – глутамат, дофамин; снижение выработки ростовых факторов, кальций, глюкокортикоиды); 2) повреждения (тепловой шок, вирусные инфекции, бактериальные токсины, онкогены – *myc*, *rel*, *E1A*, супрессоры опухоли – *p53*, цитолитиче-

ские Т клетки, оксиданты, свободные радикалы, антиметаболиты); 3) терапевтические факторы (химиотерапевтические препараты); 4) физические факторы (γ -облучение, УФ облучение); 5) токсины (этанол, β -амилоидный пептид).

К ингибиторам апоптоза относят: 1) физиологические ингибиторы (ростовые факторы, внеклеточный матрикс, CD 40 лиганды, нейтральные аминокислоты, цинк, эстрогены, андрогены); 2) вирусные гены (аденовирус *E1B*, *baculovirus p35* и *IAP*, *cowpox virus cram*, вирус Эпштейна–Барр *BHRF1*, *LMP-1*, вирус африканской свинной лихорадки *LMW5-HL*, вирус герпеса $\gamma 1$ 34.5); 3) фармакологические агенты (ингибиторы кальпаина, ингибиторы цистеиновых протеаз, промоторы опухолей – фенобарбитал, α -гексахлороциклогексан).

Цитокины – это обширная группа белков, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток при связывании со специфическими рецепторами на клетках мишенях. В отличие от гормонов, цитокины действуют, в основном, на пара- и аутокринном уровне. Цитокины подразделяются на 3 большие группы (в зависимости от структуры и функции): ростовые факторы (колониестимулирующие факторы, эпидермальный фактор роста, инсулино-подобный фактор роста и т.д.), семейство фактора некроза опухоли (TNF) и спиральные цитокины (интерлейкины, интерфероны). Эффект цитокинов на клетки также неоднозначен: для одних клеток они выступают в роли индуктора апоптоза, для других – в роли ингибитора апоптоза. Это зависит от типа клетки, от стадии ее дифференцировки, от функционального состояния клетки.

3. Генетический контроль апоптоза

Первым объектом для изучения регуляции апоптоза явилась нематода *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* состоит из 1090 соматических клеток, из которых 131 отмирает путем апоптоза в процессе развития. Два гена *C. elegans*, названных *ced-3* и *ced-4* (от англ. cell death), являются индукторами апоптоза, и мутации их приводят к выживанию почти всех клеток нематоды. *Ced-3* является протеазой, а *ced-4* содержит Ca^{2+} , Mg^{2+} -связывающий домен. Возможно, что *ced-3* и *ced-4* кодируют цитотоксические белки или белки, которые контролируют активность цитотоксических протеинов. Ген *ced-9* функционирует как репрессорный ген клеточной гибели. Нематоды с мутантным геном *ced-9* погибают на ранних стадиях развития из-за массовой гибели клеток.

Аналогом гена *ced-3* у млекопитающих является ген, кодирующий белок, названный интерлейкин-1 β -конвертирующий фермент (ICE).

Гомологами *ced-9* у млекопитающих являются члены семейства Bcl-2.

Роль белков семейства Bcl-2 в регуляции апоптоза. Процесс регулируемой клеточной гибели условно может быть разделен на несколько различных фаз: фаза инициации апоптоза, проведение сигнала, активация каспаз, активация эндонуклеаз и специфическая деградация ДНК, в результате чего наступает гибель клетки.

Если начальные фазы различаются в зависимости от типа клеток и от апоптоз-индуцирующего сигнала, то этап деградации ДНК – универсален для большинства клеток. Эта фаза является переходом к необратимой – терминальной – стадии апоптоза, которую контролируют белки семейства Bcl-2, производные одноименных генов. В связи с этим выяснение роли белков семейства Bcl-2 занимает центральное место в изучении регуляции процесса апоптоза. К настоящему времени известно, что белки этого семейства относятся либо к индукторам апоптоза (Bad, Bax, Bcl-XS, Bik, Bid, Bak), либо к ингибиторам (Bcl-2, Bcl-XL). Белки семейства Bcl-2 находятся в постоянном динамическом равновесии, образуя гомо- и гетеродимеры, что в конечном счете влияет на развитие апоптоза клеток. Поэтому считается, что соотношение активных форм этих белков определяют реостат жизни и смерти клетки. Механизм регуляции этого процесса целесообразно рассматривать с позиции структурно-функциональных взаимоотношений между белками этого семейства, которые позволяют объединить их в одно семейство – Bcl-2.

Пути активации белков семейства Bcl-2. К настоящему времени показано, что решающим моментом в запуске апоптоза является гетеродимеризация белков семейства Bcl-2. К настоящему времени изучена способность модулировать состояние белков семейства Bcl-2, по крайней мере, тремя различными механизмами.

Первый механизм связан с изменением структуры белка-индуктора апоптоза Bad, а именно его степени фосфорилирования/дефосфорилирования. Осуществляется этот механизм через рецептор интерлейкина-3 (IL-3). IL-3, связываясь со специфическим рецептором, активирует специфические киназы, которые осуществляют фосфорилирование Bad, что увеличивает его сродство к цитоплазматическому белку. При этом не происходит образование гетеродимера Bcl-2/Bad и апоптоз не развивается. В отсутствии IL-3 активируются фосфатазы, что приводит к дефосфорилированию Bad, образованию гетеродимеров Bcl-2/Bad и запуску процесса апоптоза за счет высвобождения митохондриальных факторов. Недавно установили, что таким

фактором является цитохром с, а также апоптоз-индуцирующий фактор, который, по-видимому, является протеазой. Высвобождение этих факторов приводит к распаду комплекса Bcl-2/Apaf-1/неактивная каспаза 9, что приводит к активации каспазы 9 (см. ниже).

Другой механизм регуляции функционального состояния белков семейства Bcl-2 также связан с фосфорилированием/дефосфорилированием белков-индукторов апоптоза посредством киназы Raf-1, активируемой через специфические Raf-1 рецепторы с участием G-белка – Ras. При поступлении специфического апоптогенного сигнала происходит фосфорилирование белка Bax, что уменьшает его способность образовывать гетеродимеры с Bcl-2, в результате чего происходит ингибирование апоптоза.

Третий механизм возможного ингибирования белка Bcl-2 связан с полученными недавно данными, касающимися белка Bag-1. Белок Bag-1 способен взаимодействовать с Bcl-2 и с цитоплазматическим доменом рецептора для гепатоцеллюлярного фактора роста и тромбоцитарного фактора роста. При отсутствии в среде этих факторов Bag-1 связан с Bcl-2. При взаимодействии этих факторов со специфическими рецепторами, Bag-1 взаимодействует с цитоплазматическим доменом этого рецептора, освобождая Bcl-2, что приводит к апоптозу. Вероятно, существует достаточно много способов регулировать на клеточном уровне функциональную активность белков семейства Bcl-2, как ингибиторов, так и индукторов апоптоза, посредством определенных сигнало-передающих молекул и путей, активируемых ими. Учитывая функциональную важность белков семейства Bcl-2 в регуляции такого сложного и многостороннего процесса, как апоптоз, можно утверждать, что эти белки являются перспективной мишенью для различных манипуляций с целью воздействия на судьбу клетки.

4. Механизм индукции апоптоза при повреждении ДНК

До последнего времени считалось, что нерепарируемые повреждения ДНК приводят клетку к гибели в результате нарушения функций всех биохимических систем из-за невозможности полноценной транскрипции генов, содержащих дефекты в матрице ДНК. Исследования последних лет привели к формированию принципиально новых представлений о механизме гибели клеток, имеющих повреждения ДНК, как о процессе, осуществляемом в соответствии с определенной генетической программой. В индукции этой программы при наличии повреждений в ДНК клетки важная роль принадлежит белку p53 (Science molecule of the year 1993, «molecular policeman», «guardian of the genome»). Этот белок с молекулярной массой 53 кДа локализован в ядре клетки и является одним из транскрипционных

факторов, повышенная экспрессия которого приводит к репрессии ряда генов, регулирующих транскрипцию и причастных к задержке клеток в фазе клеточного цикла G1. При повреждении ДНК под действием ионизирующего излучения или УФ-излучения, ингибиторов топоизомеразы II и некоторых других воздействиях происходит активация экспрессии гена *p53*. Блок клеточного цикла в фазах G1 и G2 до репликации ДНК и митоза, соответственно, делает возможной репарацию поврежденной ДНК и предотвращает тем самым появление мутантных клеток. Если же активность репарационных систем недостаточна и повреждения ДНК сохраняются, то в таких клетках индуцируется программируемая клеточная гибель, или апоптоз, что приводит к защите организма от присутствия клеток с поврежденной ДНК, т.е. мутантных и способных к злокачественной трансформации.

На уровне транскрипции *p53* регулирует экспрессию генов, участвующих в блокаде клеточного цикла – *p21* (ингибитор большинства циклин-зависимых киназ), либо взаимодействует с комплексами, определяющими синтез и репарацию ДНК, либо с белками, модулирующими апоптоз, – *Bax*.

Мутации гена *p53* позволяют таким клеткам сохранять жизнеспособность в митозе, что чревато выживанием клеток, подвергшихся опухолевой трансформации. И действительно, при онкологической трансформации обнаружено значительное количество мутаций гена *p53*. Мутации гена *p53* связаны с плохим прогнозом в лечении злокачественных новообразований. Такие опухолевые клетки оказываются резистентными к лучевой и химиотерапии. И, наоборот, опухоли с нормальным (диким типом) *p53* – легко поддаются лечению.

Таким образом, при действии генотоксических агентов *p53* не только увеличивает время репарации ДНК, но также защищает организм от клеток с опасными мутациями. Блокирование процесса апоптоза, происходящее на разных стадиях канцерогенеза, приводит к снижению способности трансформированных клеток активировать программу клеточной гибели, что определяет прогрессию опухолевого заболевания.

5. Молекулярные механизмы апоптоза

Апоптоз – многоэтапный процесс. Первый этап – прием сигнала, предвестника гибели в виде информации, поступающей к клетке извне или возникающей в самой клетке. Сигнал воспринимается рецептором и подвергается анализу. Иногда сигналом для начала апоптоза может быть и отсутствие необходимого сигнала. В результате контакта сигнальных молекул с наружной частью белка-рецептора этот рецептор претерпевает структурные изменения. Структурная перестройка захватывает и внутриклеточ-

ную часть молекулы рецептора. Она может либо обладать определенной ферментативной активностью сама, либо быть тесно связана с некоторыми клеточными ферментами. Изменение активности рецепторной молекулы приводит к активации фермента. Часто речь идет об изменении концентрации ионов Ca^{2+} , а также некоторых относительно мелких фосфорсодержащих органических соединений, относящихся к классу нуклеотидов. Активные соединения появляются и в результате гидролиза определенных липидов клеточной мембраны. В свою очередь, все это ведет к присоединению или отсоединению остатков фосфата от молекул белковых регуляторов (фосфорилирование), способных влиять на генетический аппарат клетки.

Далее через рецепторы или их сочетания полученный сигнал последовательно передается молекулам-посредникам (мессенджерам) различного порядка и в конечном итоге достигает ядра, где происходит включение программы клеточного самоубийства путем активации летальных и/или репрессии антилетальных генов. Однако существование апоптоза в безъядерных системах (цитопластах – клетках, лишенных ядра) показывает, что наличие ядра не является обязательным для реализации этого процесса.

6. Роль протеолиза в развитии апоптоза

Применительно к клеткам животных и человека апоптоз в большинстве случаев связан с протеолитической активацией каскада каспаз – семейства эволюционно консервативных цистеиновых протеаз, которые специфически расщепляют белки после остатков аспарагиновой кислоты. Среди каспаз различают эффекторы, т.е. ферменты, непосредственно гидролизующие структурные белки клетки, и индукторы – каспазы, которые принимают апоптотический сигнал и передают его на эффекторные каспазы. На основе структурной гомологии каспазы подразделяются на подсемейства: а) каспазы 1 (каспазы 1, 4, 5), б) каспазы 2 (каспаза 2) и в) каспазы 3 (каспазы 3, 6–10). Цистеиновые протеазы, по-видимому, участвуют также в апоптозе у растений. Однако апоптоз возможен и без участия каспаз: сверхсинтез белков-промоторов апоптоза Вах и Вак индуцирует апоптоз в присутствии ингибиторов каспаз.

В результате действия каспаз происходят следующие процессы:

- 1) активация прокаспаз с образованием каспаз;
- 2) расщепление антиапоптозных белков семейства Bcl-2. Подвергается протеолизу ингибитор ДНКазы, ответственный за фрагментацию ДНК. В нормальных клетках апоптозная ДНКаза CAD (caspase-activated DNase) образует неактивный комплекс с ингибитором CAD, обозначаемым ICAD или DFF (DNA fragmentation factor). При апоптозе ингибитор ICAD с уча-

ствием каспаз 3 или 7 инактивируется, и свободная САД, вызывая межнуклеосомальные разрывы хроматина, ведет к образованию фрагментов ДНК с молекулярной массой, кратной молекулярной массе ДНК в нуклеосомных частицах – 180–200 пар нуклеотидов. Эти фрагменты при электрофоретическом разделении в агарозном геле дают характерную «лесенку ДНК». Апоптоз возможен и без фрагментации ДНК. Обнаружен ядерный белок Acinus (apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus), из которого при комбинированном действии каспазы 3 (протеолиз при Asp 1093) и неидентифицированной протеазы (протеолиз при Ser 987) образуется фрагмент Ser 987 – Asp 1093. Этот фрагмент в присутствии дополнительных неядерных факторов вызывает апоптотическую конденсацию хроматина и фрагментацию ядра (кариорексис) без фрагментации ДНК;

3) гидролиз белков ламинов, армирующих ядерную мембрану. Это ведет к конденсации хроматина;

4) разрушение белков, участвующих в регуляции цитоскелета;

5) инактивация и нарушение регуляции белков, участвующих в репарации ДНК, сплайсинге мРНК, репликации ДНК. Мишенью каспаз является поли(ADP-рибозо)полимераза (ПАРП). Этот фермент участвует в репарации ДНК, катализируя поли(ADP-рибозилирование) белков, связанных с ДНК. Донором ADP-рибозы является НАД⁺. Активность ПАРП возрастает в 500 раз и более при связывании с участками разрыва ДНК. Апоптотическая гибель клетки сопровождается расщеплением ПАРП каспазами. Чрезмерная активация ПАРП при массивных разрывах ДНК, сильно снижая содержание внутриклеточного НАД⁺, ведет к подавлению гликолиза и митохондриального дыхания и вызывает гибель клетки по варианту некроза.

7. Пути реализации программы апоптоза

1. Путь, опосредованный физиологическими индукторами, действие которых реализуется через клеточные рецепторы, специально предназначенные для включения программы апоптоза. Этот путь передачи сигнала апоптоза схематически можно изобразить следующим образом: индукторы → рецепторы → адаптеры → каспазы первого эшелона → регуляторы → каспазы второго эшелона.

Рецепторы апоптоза (рецепторы смерти) принадлежат суперсемейству рецептора фактора некроза опухолей (TNFR)/рецептора фактора роста нервов (NGFR). Отличительной чертой членов этого суперсемейства является наличие экстраклеточного домена, содержащего повторы, богатые цистеином, – CRD (cystein rich domain). CRD формирует поверхность, ответственную за взаимодействие с лигандом.

Белки суперсемейства TNFR/NGFR относят к рецепторам смерти по признаку наличия 70–80-аминокислотного цитоплазматического домена, ответственного за белок-белковые взаимодействия и называемого доменом смерти (death domain).

Наиболее изученными рецепторами смерти являются CD95 (Apo-1, Fas) и рецептор фактора некроза опухолей 1 (TNFR1, p55). К рецепторам смерти относятся также рецептор смерти 3 (DR3, Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), рецептор смерти 5 (DR5, Apo2, TRAIL-R2, TRICK2 и KILLER), рецепторы смерти 4 и 6 (DR и 6), птичий белок CAR1. p75 – рецептор фактора роста нервов – также содержит домен смерти.

За исключением фактора роста нервов, лиганды рецепторов смерти сходны между собой по структуре и принадлежат суперсемейству фактора некроза опухолей. Лигандом для Fas является FasL (Apo2L), лигандами для TNFR1 – фактор некроза опухолей и лимфотоксин α , для рецепторов смерти 4 и 5 – TRAIL (Apo2L), для рецептора смерти 3 TWEAK (Apo3L), для рецептора смерти 6 лиганд не известен (рис. 6.1).

Рецептор, обозначаемый Fas, взаимодействуя с соответствующим лигандом (лигандом FasL), трансмембранным белком Т-киллера, активируется и запускает программу смерти клетки, инфицированной вирусом. Тем же путем при взаимодействии с лигандом FasL погибают ставшие ненужными выздоровевшему организму В-лимфоциты, продуценты антител, несущие Fas-рецептор. Для системы Fas/Fas-L не известны другие функции, кроме как индукции апоптоза клетки.

Взаимодействие рецептора и лиганда приводит к образованию кластеров рецепторных молекул и связыванию их внутриклеточных участков с адаптерами. Адаптер, связавшись с рецептором, вступает во взаимодействие с эффекторами, пока еще неактивными предшественниками протеаз из семейства каспаз первого эшелона (инициирующих каспаз). Ген Fas у человека локализован в длинном плече хромосомы 10 и состоит из 9 экзонов.

FasL – лиганд, относящийся к многочисленному семейству фактора некроза опухолей. Это семейство гомотримерных лигандов кроме FasL и TNF α включает TNF β (лимфотоксин), TRAIL (Apo2L), CD40L, CD27L, CD30L, OX40L. FasL существует в двух формах – нерастворимой, или мембраносвязанной, и растворимой, отщепляемой от клетки с помощью металлопротеиназы. Растворимая форма человеческого FasL сохраняет свою активность.

Взаимодействие адаптера с рецептором и эффектором осуществляется через гомофильные белок-белковые взаимодействия небольших доменов: DD (death domain – домен смерти), DED (death-effector domain – домен эффектора смерти), CARD (caspase activation and recruitment domain – домен

активации и рекрутирования каспазы). Все они имеют сходную структуру, содержат по шесть α -спиральных участков. Домены DD участвуют во взаимодействии рецептора Fas с адаптером FADD (Fas-associated DD-protein) и во взаимодействии рецепторов TNFR1 и DR3 (death receptor 3) с адаптером TRADD (TNFR1-associated DD-protein). Домены DED участвуют во взаимодействии адаптера FADD с прокаспазой 8 и 10. Адаптер RAIDD (RIP-associated Ich-1/CED-3 homologous protein with a death domain, RIP – receptor interacting protein) связывается с прокаспазой 2 через CARD-домены.

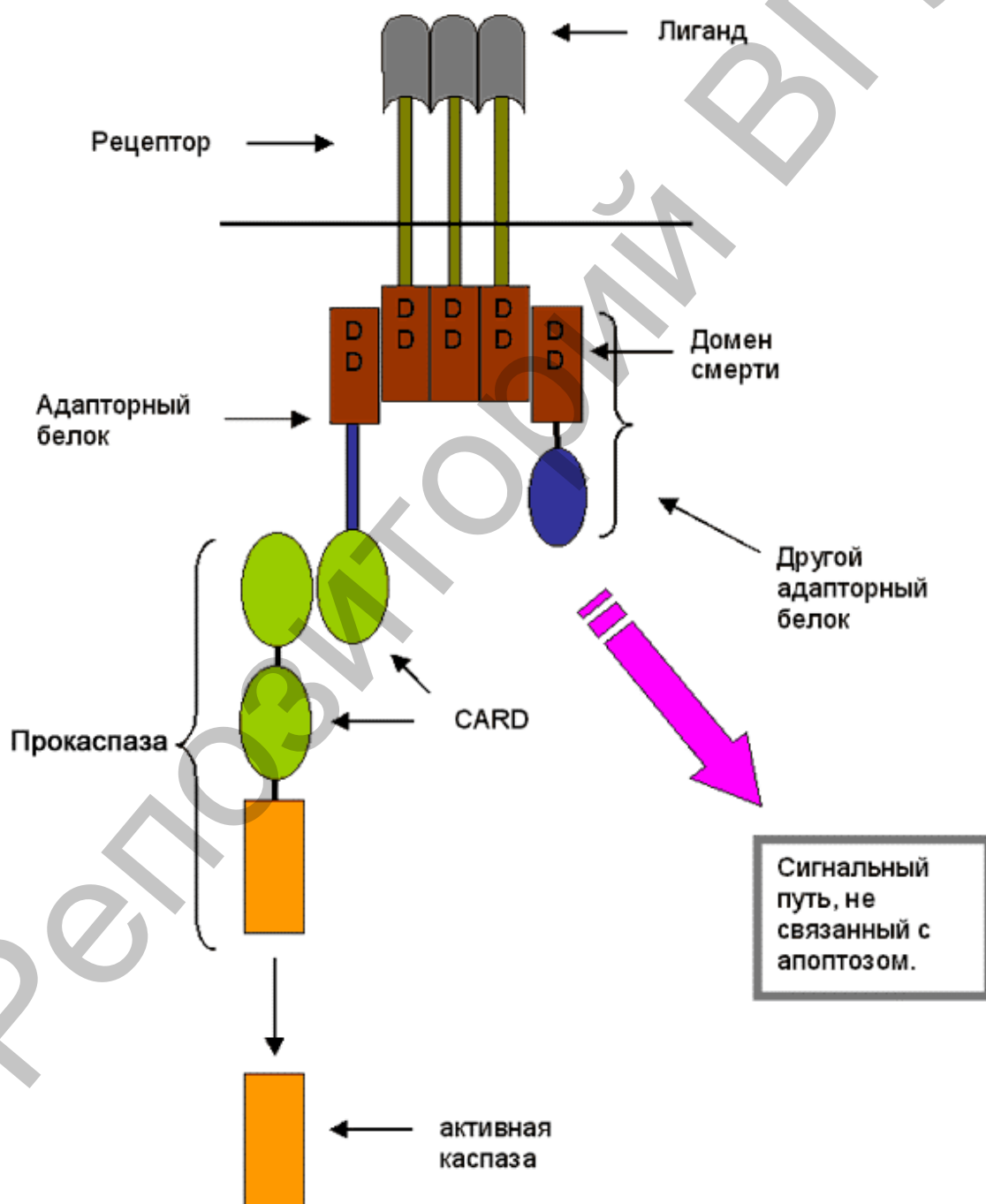


Рис. 6.1. Общая схема передачи сигнала через рецепторы.

Наиболее подробно охарактеризована прокаспаза 8 (FLICE/MACH/Mch5), рекрутируемая рецептором Fas через адаптер FADD. Образуются агрегаты FasL–Fas–FADD–прокаспаза 8. Подобные агрегаты, в которых происходит активация каспаз, названы апоптосомами, или сигнальными комплексами, индуцирующими смерть (DISC – death-inducing signaling complex).

Прокаспазы обладают незначительной протеолитической активностью, составляющей 1–2% активности зрелой каспазы. Будучи в мономерной форме, прокаспазы, концентрация которых в клетке ничтожна, находятся в латентном состоянии. Предполагается, что пространственное сближение молекул прокаспаз при их агрегации ведет к образованию активных каспаз через механизм протеолитического само- и перекрестного расщепления (ауто- или транспроцессинга). В результате от прокаспазы (молекулярная масса 30–50 кДа) отделяется регуляторный N-концевой домен (продомен), а оставшаяся часть молекулы разделяется на большую (~20 кДа) и малую (~10 кДа) субъединицы. Затем происходит ассоциация большой и малой субъединиц. Два гетеродимера образуют тетрамер с двумя каталитическими участками, действующими независимо друг от друга. Таким образом, прокаспаза 8 активируется и высвобождается в цитоплазму в виде каспазы 8.

На этапе активации каспаз первого эшелона жизнь клетки еще можно сохранить.

Существуют регуляторы, которые блокируют или, напротив, усиливают разрушительное действие каспаз первого эшелона. К ним относятся белки Bcl-2 (ингибиторы апоптоза: A1, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-XL, Bcl-1, Mcl-1 и NR13) и Bax (промоторы апоптоза: Bad, Bak, Bax, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim, Hrk, Mtd). Эти белки эволюционно консервативны: гомолог Bcl-2 обнаружен даже у губок *Geodia cydonium* и *Suberites domuncula*, у которых апоптоз необходим для морфогенеза.

Каспаза 8 активирует каспазу второго эшелона (эффекторную каспазу): путем протеолиза из прокаспазы 3 образуется каспаза 3, после чего процесс, запущенный программой смерти, оказывается необратимым. Каспаза 3 способна в дальнейшем к самостоятельной активации (автокатализу или автопроцессингу), активирует ряд других протеаз семейства каспаз, активирует фактор фрагментации ДНК, ведет к необратимому распаду ДНК на нуклеосомальные фрагменты. Так запускается каскад протеолитических ферментов, осуществляющих апоптоз.

2. Митохондриальный путь активации апоптоза. В клетках, подвергшихся воздействию индуктора апоптоза, резко снижается мембранный потенциал митохондрий. Падение мембранного потенциала обусловлено

увеличением проницаемости внутренней мембраны митохондрий (permeability transition) вследствие образования гигантских пор. К факторам, вызывающим образование пор, относятся: истощение клеток восстановленным глутатионом, НАДФН, АТФ и АДФ, образование активных форм кислорода, разобщение окислительного фосфорилирования протонными соединениями, увеличение содержания Ca^{2+} в цитоплазме, действие церамида, NO, каспаз, амфипатических пептидов, жирных кислот. Поры имеют диаметр 2,9 нм, позволяющий пересекать мембрану веществам с молекулярной массой 1,5 кДа и ниже. Следствием раскрытия поры являются набухание митохондриального матрикса, разрыв наружной мембраны митохондрий и высвобождение растворимых белков межмембранного объема. Среди этих белков – ряд апоптогенных факторов: цитохром *c*, прокаспазы 2, 3 и 9, белок AIF (apoptosis inducing factor), представляющий собой флавопротеин с молекулярной массой 57 кДа. Прокаспазу 3 обнаруживается как в межмембранном объеме митохондрий, так и в цитоплазме.

Образование гигантских пор не является единственным механизмом выхода межмембранных белков митохондрий в цитоплазму. Предполагается, что разрыв наружной мембраны митохондрий может быть вызван гиперполяризацией внутренней мембраны. Возможен и альтернативный механизм, без разрыва мембраны, – раскрытие белкового канала в самой наружной мембране, способного пропускать цитохром *c* и другие белки из межмембранного пространства.

Высвобождаемый из митохондрий цитохром *c* вместе с цитоплазматическим фактором APAF-1 (apoptosis protease activating factor-1) участвует в активации каспазы 9. APAF-1 – белок с молекулярной массой 130 кДа, содержащий CARD-домен (caspase activation and recruitment domain) на N-конце и 12 повторяющихся аминокислотных WD-40-последовательностей (WD – дипептид из триптофана и аспартата) на C-конце, образует комплекс с прокаспазой-9 в присутствии цитохрома *c* и дАТФ или АТФ (концентрация дАТФ в клетке в 1000 раз ниже концентрации АТФ. К наиболее охарактеризованным WD-белкам относится β -субъединица G-белков. Из этих субъединиц собираются жесткие, симметричные структуры, наподобие веера или пропеллера. WD-повторы свойственны белкам, участвующим в регуляции деления и дифференцировки эукариотических клеток, транскрипции генов, модификации мРНК, трансмембранной передачи сигналов, слияния мембранных везикул. Среди прокариот WD-белки обнаружены у цианобактерий.

APAF-1 играет роль арматуры, на которой происходит аутокаталитический процессинг каспазы 9. Предполагается, что в результате зависимого

от гидролиза дАТФ (или АТФ) конформационного изменения, АРАФ-1 приобретает способность связывать цитохром *c*. Связав цитохром *c*, АРАФ-1 претерпевает дальнейшее конформационное изменение, способствующее его олигомеризации и открывающее доступ CARD-домена АРАФ-1 для прокаспазы 9, которая тоже содержит CARD-домен. Так образуется конструкция, называемая тоже апоптосомой, с молекулярной массой $> 1,3$ млн дальтон, в составе которой – не менее 8 субъединиц АРАФ-1. Благодаря гомофильному CARD-CARD-взаимодействию с АРАФ-1 в эквимольном соотношении связывается прокаспаса 9, а затем прокаспаса 9 связывает прокаспазу 3. Пространственное сближение молекул прокаспазы 9 на мультимерной арматуре из АРАФ-1-цитохром-*c*-комплексов, по-видимому, приводит к межмолекулярному протеолитическому процессингу прокаспазы 9 с образованием активной каспазы 9. Сходный механизм предложен для активации прокаспазы CED-3 у червя *Caenorhabditis elegans* – аналога прокаспазы 9 млекопитающих. Альтернативный вариант – прокаспаса 9, – связавшись с апоптосомой, может принять конформацию, которая приводит к внутримолекулярному процессингу (самоактивации). Зрелая каспаза 9 затем расщепляет и активирует прокаспазу 3.

Кроме рассмотренных компонентов при нарушении наружной мембраны митохондрий из межмембранного пространства выделяется термолабильный фактор, вызывающий необратимое превращение ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. Фактор устойчив к ряду испытанных ингибиторов протеаз, включая каспазы, сериновые и металлопротеазы. Ксантиндегидрогеназа катализирует зависимое от НАД⁺ окисление ксантина до гипоксантина и последующее окисление гипоксантина до мочевой кислоты. Ксантиноксидаза катализирует те же реакции, но не с НАД⁺, а с O₂ в качестве акцептора электронов. При этом образуются O₂A, H₂O₂, а из них – и другие активные формы кислорода (АФК), которые разрушают митохондрии и являются мощными индукторами апоптоза.

Некоторые клетки, например, клетки эмбриональной нервной системы, включают механизмы апоптоза, если они испытывают дефицит апоптозподавляющих сигналов (называемых также факторами выживания) от других клеток. Физиологический смысл процесса состоит в элиминации избыточных нервных клеток, конкурирующих за ограниченный фонд факторов выживания. Эпителиальные клетки при отделении от внеклеточного матрикса, вырабатывающего факторы выживания, тоже обречены на апоптоз. Факторы выживания связываются соответствующими цитоплазматическими рецепторами, активируя синтез подавляющих апоптоз агентов и блокируя стимуляторы апоптоза. Некоторые вещества (например, стероидные гормоны)

оказывают дифференцированный эффект на различные типы клеток – предотвращают апоптоз одних типов клеток и индуцируют его у других.

3. Реализация в ряде случаев апоптоза в результате комбинированного действия двух путей – с участием и рецепторов плазматической мембраны, и митохондриального цитохрома *c*.

Различные пути апоптоза могут взаимодействовать между собой. В некоторых случаях зависимый от рецепторов путь ведет к малоэффективной активации прокаспазы 8. В этом случае подключается зависимый от митохондрий путь апоптоза: каспаза 8 (образовавшаяся в небольших количествах) взаимодействует в цитоплазме с белком Bid из семейства Bax, расщепляя его надвое. С-концевой домен Bid далее внедряется в митохондриальную мембрану, индуцируя выход цитохрома *c* из митохондрий и его связывание с APAF-1.

4. Путь передачи сигнала апоптоза с участием эндоплазматического ретикула (ЭР). В ЭР локализована прокаспаса 12. Нарушение внутриклеточного Ca^{2+} -гомеостаза ведет к апоптозу клеток, вызванному превращением прокаспазы 12 в каспазу 12. ЭР-зависимый апоптоз связан с болезнью Альцгеймера: кортикальные нейроны мышей, дефицитных по каспазе 12, устойчивы к апоптозу, индуцированному I-амилоидным белком, но не к апоптозу с участием рецепторов плазматической мембраны или митохондриального цитохрома *c*.

5. Вызывание апоптоза цитотоксическими лимфоцитами, т-киллерами, у инфицированных клеток с помощью белка перфорина. Полимеризуясь, перфорин образует в цитоплазматической мембране клетки-мишени – трансмембранные каналы, по которым внутрь клетки поступают TNF β , гранзимы (фрагментины) – смесь сериновых протеаз. Существенным компонентом этой смеси является гранзим В – протеолитический фермент, превращающий прокаспазу 3 в активную каспазу 3.

6. Осуществление взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом с помощью интегринов. Интегрины – большое семейство гетеродимерных мембранных белков, которые участвуют в адгезии клеток, связывая внутриклеточный цитоскелет с лигандами внеклеточного матрикса. Нарушение адгезии клеток индуцирует апоптоз. Большинство интегринов специфически взаимодействует с трипептидным RGD (аргинин-глицин-аспарат)-мотивом, входящим в состав белков внеклеточного матрикса. Растворимые низкомолекулярные RGD-содержащие пептиды являются эффективными индукторами апоптоза: проникая в клетки, они активируют латентную каспазу 3. Ряд каспаз, включая каспазу 3, содержит RGD-последовательность вблизи активного центра фермента. В молекуле про-

каспазы эта последовательность, вероятно, вовлечена во внутримолекулярное взаимодействие, придающее молекуле профермента такую конформацию, при которой протеазная активность не может проявиться. Предположительно RGD-последовательность взаимодействует с последовательностью DDM (аспартат-аспартат-метионин), локализованной вблизи участка протеолитической активации прокаспазы 3. Низкомолекулярный RGD-пептид, проникая в клетку и вступая в конкурентные взаимоотношения с RGD-последовательностью прокаспазы 3, вытесняет ее из сферы взаимодействия с DDM-последовательностью молекул профермента и индуцирует изменение их конформации, олигомеризацию и аутопроцессинг прокаспазы 3 с образованием активной каспазы 3.

7. Особая форма апоптоза, которую претерпевают эритроциты млекопитающих. Биогенез эритроцитов из стволовой клетки в костном мозге включает ряд промежуточных этапов. На этапе эритробласта ядро изгоняется (выталкивается) из клетки и пожирается макрофагом. Альтернативный вариант: кариорексис (деструкция ядра) с образованием телец Жолли и их последующий распад и лизис внутри клетки. Безъядерная клетка, называемая ретикулоцитом, в дальнейшем теряет митохондрии и рибосомы и превращается в эритроцит. Потерю ядра эритробластом можно рассматривать как особую форму ядерного апоптоза. Выяснение его механизма позволило бы применить его для обезвреживания опухолевых клеток. Эритроцит человека функционирует около 4 месяцев, а затем, поизносившись, исчезает в ретикулоэндотелиальной системе, не причиняя неудобств окружающим клеткам. Лишенный ядра и митохондрий эритроцит, исполнив свое назначение, по-видимому, включает программу гибели, чтобы после этого поступить в макрофаги печени и селезенки. Однако ингибитор протеинкиназы стауроспорин и ингибитор синтеза белка циклогексимид (индуцирующий апоптоз у большинства испытанных типов клеток млекопитающих) не вызывает апоптоз у безъядерных эритроцитов человека. Стауроспорин и циклогексимид, а также отсутствие сыворотки в среде инкубации индуцируют гибель эритроцитов цыпленка (содержащих транскрипционно неактивное клеточное ядро) с выраженными признаками апоптоза по пути, который реализуется без участия каспаз.

8. Апоптоз в биологии и медицине

1. Апоптоз и иммунная система

Вирусы, некоторые бактерии, грибы и простейшие являются внутриклеточными паразитами. Хотя специфичные к ним антитела вырабатываются организмом человека или животного, они не могут уничтожить пара-

зита, находящегося в цитоплазме и защищенного клеточной мембраной. Цитотоксические Т-лимфоциты (Т-киллеры), обладая аппаратом распознавания зараженной клетки (клетки-мишени) среди массы здоровых клеток, вызывают ее гибель, включая программу апоптоза, и прекращают дальнейшее размножение возбудителя.

2. Апоптоз у животных

В многоклеточном организме апоптозом гибнут клетки в процессе эмбриогенеза, Т-клетки в процессе дифференцировки в тимусе, клетки, зараженные вирусами, измененные клетки (при недостаточной интенсивности апоптотических процессов развиваются онкологические заболевания) и мн. др. Основное биологическое назначение апоптоза состоит в том, чтобы в процессе эмбрионального морфогенеза создавать органы и ткани с эволюционно закрепленными конфигурациями и размерами и затем поддерживать эти параметры с допустимыми допусками в течение жизни. Важнейшим проявлением этой функции апоптоза после окончания развития человека и других млекопитающих является его участие в процессе физиологической регенерации (обновления) клеток разных тканей и органов и поддержании клеточного гомеостаза. Регенерации в разной степени выраженности на протяжении всей жизни подвержены практически все клетки нашего организма. Особенно интенсивно клеточное обновление протекает в клетках эпителия, соприкасающихся с внешней средой, кожи, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой и легочной систем, а также в клетках крови, иммунной системы. Важна роль и в процессах отторжения чужеродных органов и тканей при их трансплантации.

Другой важнейшей функцией апоптоза является контроль за внутренней средой клетки, в том числе клеточного ядра с его содержимым. Апоптоз принимает активное участие в ряде физиологических и патологических процессов. Например, при гормонзависимой инволюции органов у взрослых, в частности, отторжении эндометрия во время менструального цикла, атрезии (заращении) фолликулов в яичниках в менопаузе и регрессии (обратном развитии) молочной железы после прекращения лактации.

Велика роль апоптоза и при патологической атрофии гормонзависимых органов, например, атрофии предстательной железы после кастрации и истощении лимфоцитов в тимусе при терапии глюкокортикоидами или патологической атрофии паренхиматозных органов после обтурации (закупорки) выводных протоков, что наблюдается в поджелудочной и слюнных железах, почках. Гибель клеток в процессе атрофии наблюдается и в коре надпочечников при воздействии глюкокортикоидов или при атрофии тканей-мишеней гормонов. Во многих случаях острого или хронического

ишемического либо токсического воздействия гибель клеток происходит через апоптоз. Такая картина наблюдается при инсульте, инфаркте не только миокарда, но и в почках, при диабете, отдельных формах нефрита, нейродегенеративных заболеваниях, таких, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. В патогенезе токсических повреждений печени, поджелудочной железы и почек активация апоптоза также имеет важное значение.

3. Апоптоз у растений

Ксилогенез и флоэмогенез. Клетки, которым предстоит стать трахеидами ксилемы, выполняющей водопроводящую и опорную функцию, претерпевают дробление протопласта на везикулы, характерные для апоптоза животных. Развитие ситовидных трубок флоэмы тоже сопровождается дроблением ядра, как при апоптозе. Показано существование генов *ted2*, ответственных за реализацию процесса сосудообразования.

Формообразование листьев. Очертания листьев у растений, по видимому, формируются через механизм апоптоза. У представителей р. *Monstera* (сем. Аронниковые) места перфораций, наличие лопастей определяется зонами гибели клеток на ранних стадиях развития. Этот процесс также находится под генетическим контролем.

Аэренхимогенез. Это адаптивная реакция растений на дефицит кислорода, например, при затоплении, заключающаяся в образовании полостей, заполненных воздухом, за счет элиминации некоторых клеток с полным разрушением клеточных стенок с участием активирующихся гидролитических ферментов.

Клетки корневого чехлика. Эти клетки защищают апикальную меристему корня при прорастании семян. Программа гибели этих клеток включается даже при выращивании растений гидропонным способом.

Опадание листьев и созревших плодов. Эти процессы сопровождаются избирательной гибелью клеток отдельной зоны, расположенной между основанием черешка листа или плода и стеблем, которая активируется благодаря экспрессии так называемых *sag*-генов (*senescence-associated genes*). Клетки в отдельном слое секретируют ферменты, разрушающие клеточные стенки (пектиназы и целлюлазы). Локально действуя на определенный участок, ферменты частично растворяют клеточную стенку в отдельном слое, а сами клетки отдельного слоя подвергаются автолизу, клеточные полимеры распадаются. Одновременно с этим в слое клеток со стороны стебля откладывается водоустойчивый суберин, защищающий оголенный участок ткани, возникающий после отделения листа в результате ферментативного гидролиза полимеров.

Прорастание пыльцевой трубки. Этот процесс осуществляется в результате гибели клеток на пути прорастающей пыльцевой трубки, зависит от видовой принадлежности пыльцы и не включается при действии чужеродной пыльцы.

Алейроновые клетки. В семенах однодольных растений имеются алейроновые клетки. При прорастании семян эти клетки секретируют ферменты, катализирующие гидролиз запасных полимеров эндосперма и обеспечивающие тем самым питание проростка. Будучи ненужными для последующего развития, алейроновые клетки погибают по завершении прорастания. По ряду признаков их гибель имеет характер апоптоза. Ядерная ДНК расщепляется на олигонуклеотидные фрагменты, процесс стимулируется гиббереловой и блокируется абсцизовой кислотой. В расщеплении ДНК принимают участие нуклеазы, активность которых регулируется гиббереловой и абсцизовой кислотой.

Соматический эмбриогенез. В суспензионных культурах клеток некоторых видов растений индуцируется соматический эмбриогенез: из одиночных клеток можно вырастить взрослые растения – свойство тотипотентности растений. Тотипотентные клетки делятся асимметрично на две клетки, одна из которых останавливает синтез ДНК и погибает с признаками ПКС, тогда как другая, продолжая развиваться, дает проросток.

Иммунная реакция на патоген. Устойчивость растения к патогену определяется способностью распознать и своевременно включить механизм защиты. Наряду с индукцией синтеза фитоалексинов (растительных антибиотиков) и гидролитических ферментов к таким механизмам относится активация в инфицированных клетках и клетках, локализованных вблизи очага инфекции, программы собственной гибели, – процесс, называемый гиперчувствительным ответом (ГО). Образуется зона мертвых обезвоженных клеток, которая служит барьером для дальнейшего распространения патогена. ГО – ответ растений на патогенные вирусы, бактерии, грибы и нематоды. При этом гибель клеток растений вызвана не прямым деструктивным действием патогена, а активацией патогеном генетической программы гибели растительной клетки. Процесс сопровождается дыхательным взрывом – генерацией O_2A при участии НАДФН-оксидазы цитоплазматической мембраны, подобной таковой у макрофагов и нейтрофилов млекопитающих. Кроме НАДФН-оксидазы, H_2O_2 в клетках растений образуется при участии пероксидаз клеточной стенки, оксалатоксидазы, а также при окислении НАД⁺-зависимых субстратов или сукцината комплексами I или II дыхательной цепи митохондрий. ГО на одном или нескольких листьях растения ведет к развитию иммунитета в других листьях, которые не

имели контакта с патогеном. Такой иммунитет у растений называют системной приобретенной устойчивостью.

Изменения в морфологии клеток растений, претерпевающих апоптоз, сходны с таковыми при апоптозе у животных. Также наблюдается конденсация и дробление ядра на фрагменты, сжатие протопласта и складчатость цитоплазматической мембраны. Происходит разрыв плазмодесм – мембранных мостиков, сообщающих содержимое соседних клеток, по которым происходит распространение инфекции из зараженной клетки в соседние. Сжатие протопласта приводит к отделению его от клеточной стенки. В конечном итоге протопласт дробится на отдельные везикулы, аналогичные апоптозным тельцам.

Тогда как у животных апоптозные везикулы *in vivo* поглощаются соседними или специализированными клетками, у растений нет таких специализированных клеток. Более того, фагоцитозу препятствует наличие клеточной стенки. Апоптозные везикулы у растений в дальнейшем разрушаются. Такая деградация может стимулироваться ферментами, секретлируемыми соседними клетками. И в конечном итоге останки разрушенных клеток утилизируются другими клетками, что отмечается при отмирании листьев. При отмирании листа клеточные полимеры распадаются, а мономеры вновь используются растением. Однако такой вариант заключительного этапа клеточной гибели невозможен при ГО, поскольку отмершие клетки несут в себе патоген. В этом случае образуются так называемые демаркационные, отторгающие, ткани вследствие приобретения здоровыми клетками, расположенными вокруг места поражения, меристематической активности. Возникает перидерма, отгораживающая очаг инфекции. Судьба же клеточной стенки, атрибута растительной клетки, неоднозначна.

4. Апоптоз и старение

В 1982 году С.Р. Уманский предложил гипотезу, согласно которой старение может быть следствием плеiotропного эффекта группы генов, несущих информацию о запрограммированной гибели клетки (апоптозе). С одной стороны, эта программа необходима для развития и функционирования многоклеточного организма. Вместе с тем она делает неизбежной гибель клеток у взрослого организма. В таком случае старение является следствием постепенной убыли функционально активных клеток (Уманский, 1982). До сих пор идут дискуссии о роли апоптоза в процессе старения. Часть исследователей во главе с академиком Скулачевым являются сторонниками теории клеточного апоптоза. Старение, с точки зрения Скулачева, – результат того, что в организме гибнет больше клеток, чем рождается, а отмирающие функциональные клетки заменяются соединитель-

ной тканью. Суть его работы – поиск методов противодействия разрушению клеточных структур свободными радикалами. По мнению ученого, старость – это болезнь, которую можно и нужно лечить, программу старения организма можно вывести из строя и тем самым выключить механизм, сокращающий нашу жизнь.

Лабораторная работа

Определение апоптоза с использованием изолированных гепатоцитов

Реактивы и оборудование: 1) 35 мм культуральные чашки; 2) CO₂-инкубатор; 3) вакуумный аспиратор; 4) эппендорфовские пробирки; 5) центрифуга с охлаждением; 6) фосфатный буфер (рН 7,4); 7) Трис-НСl 10 mM и 100 mM; 8) NaCl 200 mM; 9) ЭДТА 5 mM; 10) додецилсульфат натрия 2%; 11) протеинкиназа К (20 мг/мл); 12) фенол; 13) хлороформ; 14) изоамиловый спирт; 15) 70% этанол; 16) рибонуклеаза А (10 мг/мл); 17) агароза; 18) этидиум бромид; 19) спектрофотометр; 20) прибор для электрофореза; 21) устройство с источником УФ для оценки фрагментации ДНК; 22) камера для выполнения фотоснимков.

Изолированные гепатоциты (по 1,5 мл суспензии, плотность $0,5 \times 10^6$ клеток/мл) пассируют на обработанные коллагеном 35 мм культуральные чашки. Через 2 часа среду заменяют и добавляют исследуемые препараты. Контроль – среда культивирования. Через 4 часа инкубации при температуре 37 °C в атмосфере с 5% CO₂ клетки промываются холодным фосфатным буфером и лизируются буфером, содержащим 100 mM Трис-НСl [рН 8,0], 200 mM NaCl, 5 mM ЭДТА и 2% раствор додецилсульфата натрия и через 15 минут механически снимаются с плашек и переносятся в эппендорфовские пробирки. Затем к гепатоцитам добавляется протеинкиназа К (20 мг/мл) и смесь инкубируется в течение ночи при 56 °C. ДНК экстрагируется смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1) (центрифугирование 30 мин, 15000 g, при 4 °C), промывается 70% этанолом, осадок высушивается (перевернув пробирку на фильтровальную бумагу), ресуспендируется в 10 mM Трис-НСl и обрабатывается рибонуклеазой А (10 мг/мл) в течение 30 мин при температуре 37 °C. Спектрофотометрически определяют количество полученной ДНК (λ 260 и 280 nm). Электрофорез ДНК (5 мкг/проба) осуществляют в 1,5% агарозном геле, окрашенном этидиум бромидом, при 35 V в течение 4 часов. Наличие апоптоза оценивают по образованию при электрофорезе «ДНК-лестницы», которая выявляется при пропускании ультрафиолетовых лучей через гель.

Для оценки морфологических признаков апоптоза изолированные гепатоциты культивируют в покрытых коллагеном 35 мм пластиковых чашках с покровными стеклами ($0,3 \times 10^6$ клеток/мл). Клетки инкубируют в присутствии препаратов в течение 4 часов. После инкубации среду удаляют, клетки промывают дважды средой William E, покровные стекла с гепатоцитами окрашивают 15 мин красителем Hoechst 33342 (50 мкг/мл), промывают дважды фосфатным буфером и фиксируют 20 мин в 5% растворе формальдегида.

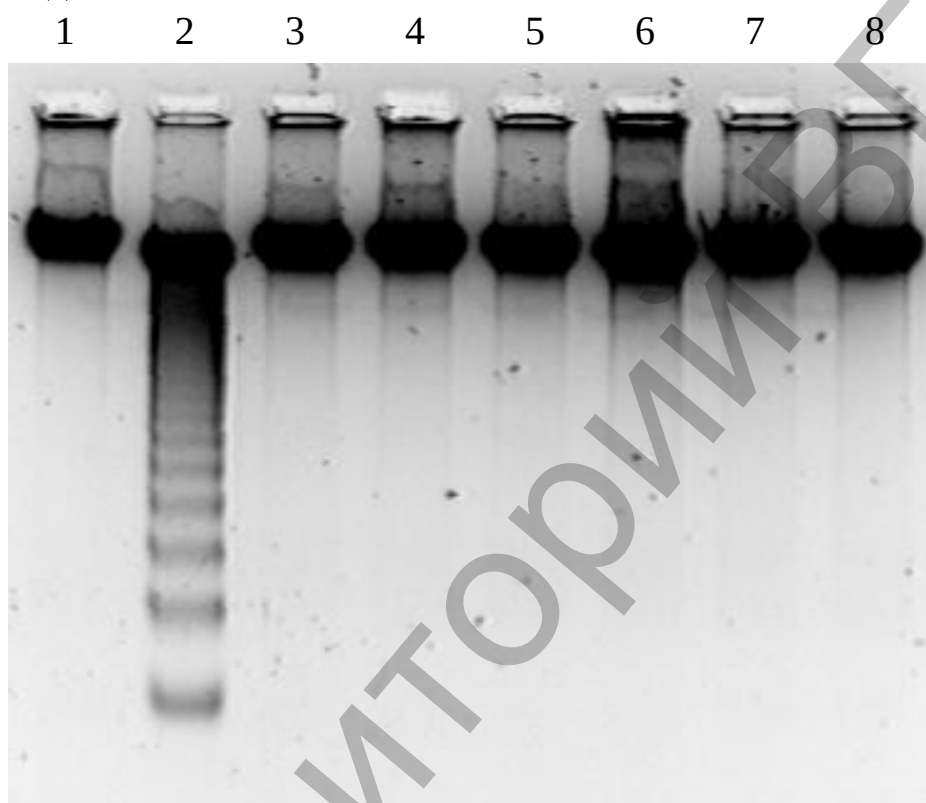


Рис. 6.2а. Влияние ГХДХК, ТУДХК, УДХК и ЭСХ на межнуклеосомную фрагментацию ДНК. 1 – контроль, 2 – ГХДХК (50 мкг/мл), 3 – ТУДХК (50 мкг/мл), 4 – ТУДХК (200 мкг/мл), 5 – УДХК (50 мкг/мл), 6 – УДХК (200 мкг/мл), 7 – ЭСХ (50 мкг/мл), 8 – ЭСХ (200 мкг/мл).

Морфологию ядер оценивают с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus AX 70. Апоптотическими считают клетки с явными признаками конденсации хроматина или фрагментации ядра. Подсчитывают 500 клеток и количество апоптотических клеток выражают как процент от общего числа клеток. Для оценки количества некротических клеток гепатоциты окрашивают пропидиум йодидом по аналогичной методике.

В качестве примера рассмотрим эффект гепототропных субстанций – желчных кислот – гликохенодезоксихолевой кислоты (ГХДХК), тауроурсодезоксихолевой кислоты (ТУДХК), урсодезоксизолевой кислоты (УДХК) и экстракта солянки холмовой (ЭСХ) на апоптоз гепатоцитов. Как видно на

рис. 6.2, инкубация клеток печени с гликохенодезоксихолевой кислотой в концентрации 50 мкг/мл вызывает апоптоз, что доказывается образованием типичной «ДНК-лестницы», конденсацией хроматина и фрагментацией ядра (рис. 6.2а, 6.3). ТУДХК, УДХК и ЭСХ не вызывали апоптоз гепатоцитов (рис. 6.2а).

Однако ТУДХК и УДХК оказывали антиапоптозогенный эффект, характеризующийся отсутствием «ДНК-лестницы» при электрофорезе при совместной инкубации с ГХДХК (рис. 6.2б). Если сравнить выраженность этого эффекта, то ТУДХК обладает более выраженным антиапоптозогенным эффектом по сравнению с УДХК. ЭСХ не влиял на апоптоз гепатоцитов, вызванных ГХДХК.

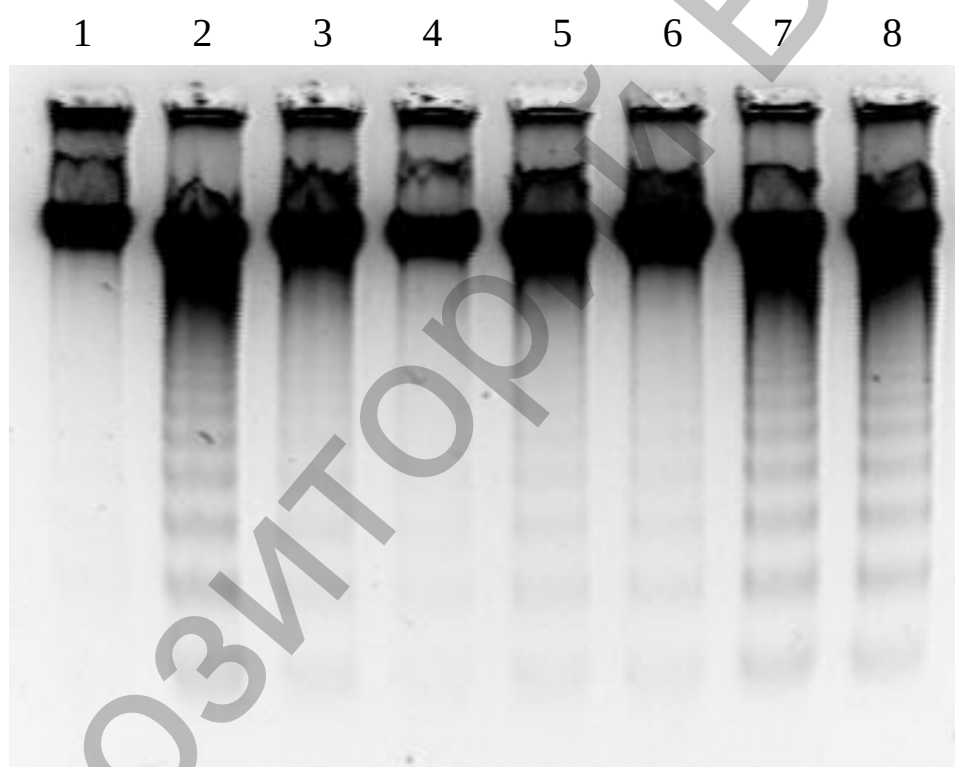


Рис. 6.2б. Влияние препаратов УДХК, ТУДХК и ЭСХ на межнуклеосомную фрагментацию ДНК при инкубации с ГДХК (50 мкг/мл). 1 – контроль, 2 – ГХДХК 50 мкг/мл, 3 – ГХДХК +ТУДХК 50 мкг/мл, 4 – ГХДХК + ТУДХК 200 мкг/мл, 5 – ГХДХК + УДХК 50 мкг/мл, 6 – ГХДХК + УДХК 200 мкг/мл, 7 – ГХДХК + ЭСХ 50 мкг/мл, 8 – ГХДХК + ЭСХ 200 мкг/мл.

Контрольные вопросы

1. Какие виды клеточной смерти Вы знаете?
2. Охарактеризуйте отличия некроза от апоптоза.
3. Назовите основные индукторы и ингибиторы апоптоза.

4. Какова роль белков семейства Bcl-2 в регуляции апоптоза?
5. Каковы механизмы индукции апоптоза при повреждениях ДНК?
6. Охарактеризуйте основные этапы апоптоза.
7. Какова роль протеолиза в развитии апоптоза?
8. Назовите основные пути реализации программы апоптоза.
9. Охарактеризуйте роль апоптоза в функционировании системы иммунитета.
10. Назовите особенности апоптоза у животных и растений.
11. Какова роль апоптоза при старении живых организмов?

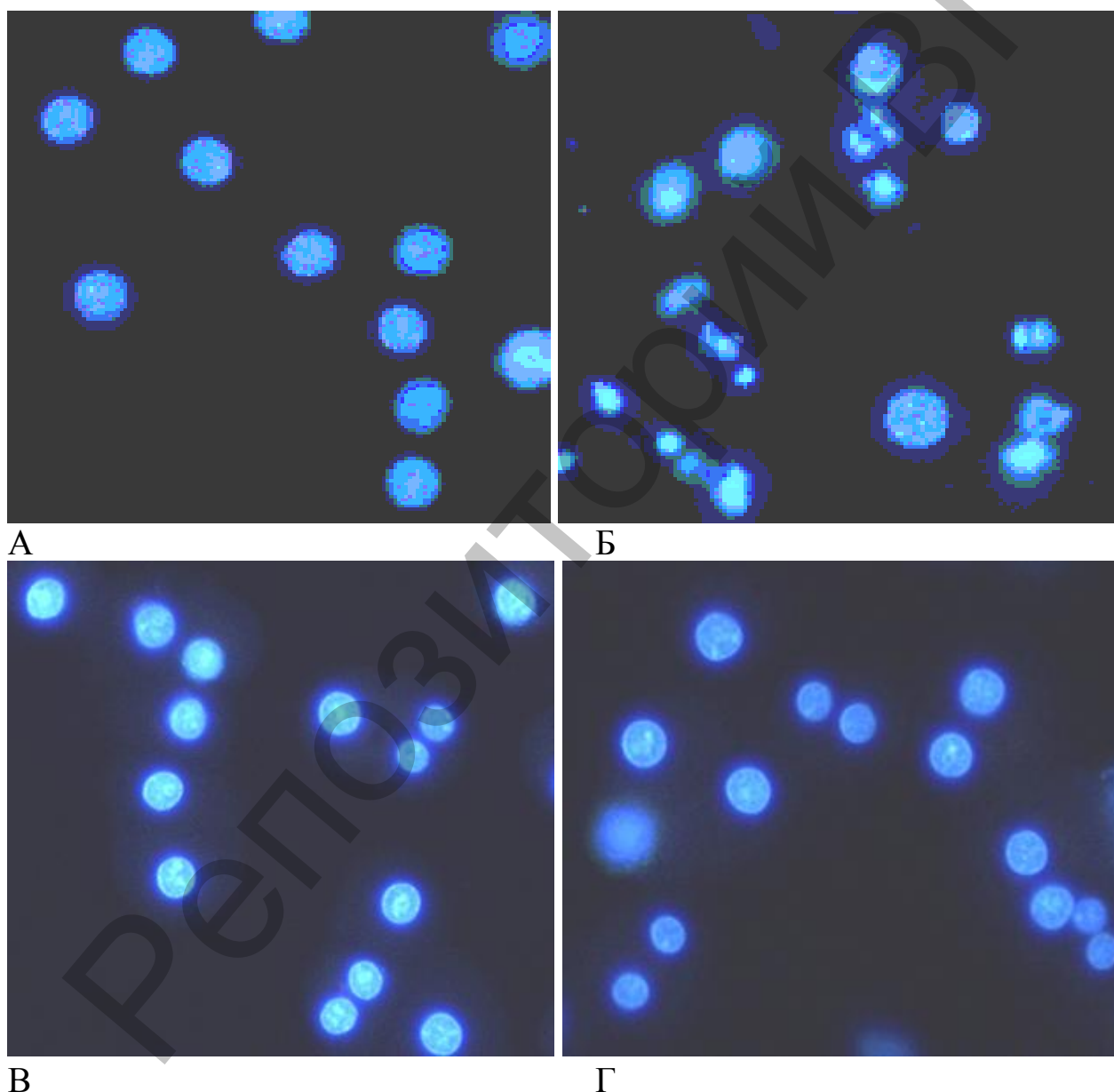


Рис. 6.3. Конденсация хроматина и фрагментация ядер при инкубации гепатоцитов с препаратами: А – контроль, Б – ГХДХК, 50 мкг/мл, В – ЭСХ, 200 мкг/мл, Г – ГХДХК 50 мкг/мл + ТУДХК 50 мкг/мл.

Литература

1. Аббасова, С.Г. Система Fas-FasL в норме и при патологии / С.Г. Аббасова [и др.] // Вопросы биол. мед. и фарм. химии. – 1999. – № 3. – С. 3–16.
2. Белушкина, Н.Н. Молекулярные основы апоптоза / Н.Н. Белушкина [и др.] // Вопросы биол. мед. и фарм. химии. – 1998. – № 4. – С. 15–23.
3. Чиркин, А.А. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, О.Ю. Абакумова // Молекулярная и биохимическая фармакология. Матер. междунар. научн. конф., посвященной 80-летию НАНБ. Гродно, 25–26 сентября 2008. – Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2008. – С. 80–82.
4. Лушников, Е.Ф. Апоптоз клеток: морфология, биологическая роль, механизмы развития / Е.Ф. Лушников, В.М. Загребин // Архив патологии. – 1987. – Т. 49. – С. 84–89.
5. Уманский, С.Р. Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы / С.Р. Уманский // Молекулярная биология. – 1996. – Т. 30, вып. 3. – С. 487–502.
6. Ярилин, А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах / А.А. Ярилин // Иммунология. – 1996. – Т. 6. – С. 10–23.
7. Abastado, J.-P. Apoptosis: function and regulation of cell death / J.-P. Abastado // Res. Immunol. – 1996. – Vol. 147. – P. 443–456.
8. Ashkenazi, A. Death receptors: signaling and modulation / A. Ashkenazi, V.M. Dixit // Science. – 1998. – Vol. 281. – P. 1305–1308.
9. Baker, S.J. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily / S.J. Baker, E.P. Reddy // Oncogene. – 1998. – Vol. 17. – P. 3261–3270.
10. Baud, V. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives / V. Baud, M. Karin // Trends Cell. Biol. – 2001. – Vol. 11. – P. 372–377.
11. Bortner, C.D. Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in anti-Fas-induced apoptosis / C.D. Bortner, M. Gomez-Angelats, J.A. Cidlowski // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 4304–4314.
12. Chirkin, A.A. Apoptosis, necrosis and hepatotropic preparations / A.A. Chirkin, E.O. Danchenko, R. Dargel // Medical Science. – 1999. – Vol. 5, Suppl. 1. – P. 109–116.
13. Gomez-Angelats, M., PKC inhibits FADD recruitment and DISC formation during FAS/CD95 induced apoptosis / M. Gomez-Angelats, J.A. Cidlowski // Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 44944–44952.

14. Green, D.R. Mitochondria and Apoptosis / D.R. Green, J. Reed // Science. – 1998. – Vol. 281. – P. 1309–1312.
15. Ellis, H.M. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans* / H.M. Ellis, H.R. Horvitz // Cell. – 1986. – Vol. 44. – P. 817–829.
16. Lane, D. p53, guardian of the genome / D. Lane // Nature. – 1992. – Vol. 358. – P. 15–18.
17. Magno, G. Apoptosis, oncosis, necrosis / G. Magno, I. Joris // Amer. J. Pathol. – 1995. – Vol. 146. – P. 3–15.
18. Martelli, A.M. Nuclear apoptotic changes: an overview / A.M. Martelli [et. al.] // J. Cell. Biochem. – 2001. – Vol. 82. – P. 634–646.
19. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease / C.B. Thompson // Science. – 1995. – Vol. 267. – P. 1457–1462.
20. Thornbery, N.A. Caspases: Enemies Within / N.A. Thornbery, Y. Lazebnik // Science. – 1998. – Vol. 281. – P. 1312–1316.
21. Zou, H. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9 / H. Zou [et. al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274. – P. 11549–11556.

ГЛАВА 7. РЕПЛИКАТИВНОЕ СТАРЕНИЕ КЛЕТОК: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ И МЕТОДЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

В 1961 г. Hayflick и Moorhead [1] заметили, что нормальные соматические клетки имеют ограниченное количество делений. Этот феномен был назван «Лимитом Хэйфлика». Оловников предположил, что данный феномен является результатом неполной репликации концов хромосом [2]. В середине 1970-х годов Blackburn и Gall [3] клонировали первую теломерную структуру ресничных инфузорий *Tetrahymena thermophila* и обнаружили повторы из нуклеотидов TTGGGG. Спустя 10 лет была определена теломерная последовательность человека TTAGGG [4]. Затем Greider и Blackburn обнаружили у *Tetrahymena* фермент, ответственный за синтез теломер – теломеразу [5]. С этого момента явление репликативного старения клеток, функционирование теломер и теломеразы рассматривается как единая концепция.

1. Структура и функции теломер

Для функционирования полимеразы, фермента синтеза ДНК, необходимы малые молекулы РНК – праймеры для синтеза новой цепи. В процессе синтеза новой цепи ДНК праймеры удаляются и на их месте синтезируется участок дочерней цепи. При удалении последнего праймера 3'-концевой участок дочерней цепи оказывается недосинтезированным (рис. 7.1) [6].

Происходит постоянная потеря нуклеотидов с концов хромосом при каждом цикле репликации. Для предотвращения потери функционально-значимых нуклеотидных последовательностей на концах хромосом располагаются особые структуры – теломеры.

Теломеры – ДНК-белковые комплексы, расположенные на концах хромосом всех эукариотических и некоторых прокариотических организмов.

Термин теломер происходит от сочетания греческих слов *telos* – конец и *meros* – часть. Теломеры различных организмов имеют различное строение. Теломеры человека состоят из двуцепочечных повторов 5'-(TTAGGG)_n в количестве 2–30 пар оснований и заканчиваются на 3'-конце одноцепочечной цепью из 50–100 нуклеотидов (т.н. 3'overhang). Теломерный конец хромосом загибается под углом 180° и образует Т-петлю, а 3'overhang взаимодействует с комплементарным участком комплементарной цепи и образует D-петлю (рис. 7.2).

Некоторые последовательности ДНК, содержащие большое количество гуанина, при некоторых условиях могут образовывать структуры из 4-х гуаниновых оснований, называемые G-quadruplex. Такие структуры были обнаружены на концах хромосом в теломерах. G-quadruplex образуются при взаимодействии 4-х близкорасположенных гуанинов, соединенных друг с другом 8-ю хугстиновскими водородными связями (рис. 7.3).

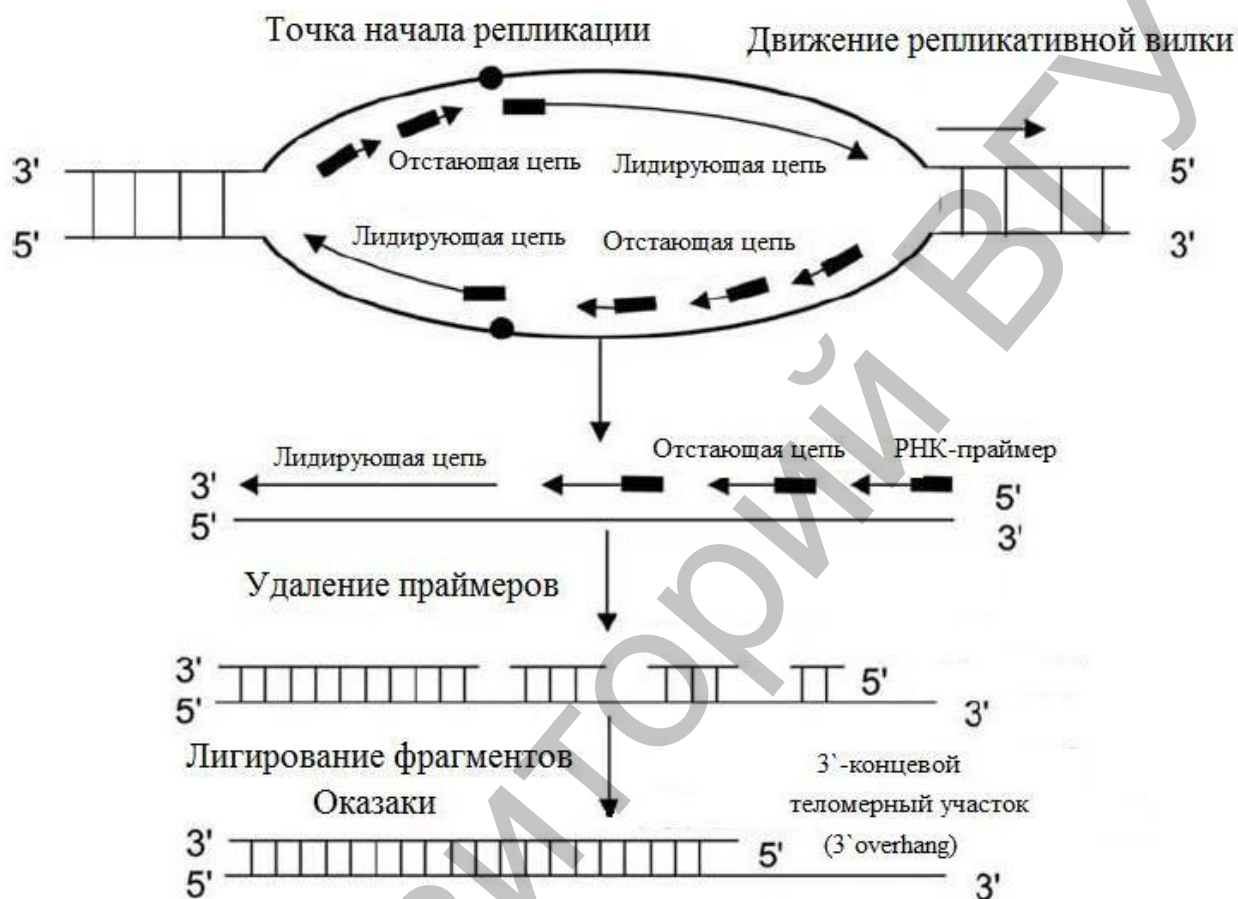


Рис. 7.1. Схематическое изображение процесса потери нуклеотидов с концов хромосом при каждом цикле репликации.

Каждый гуанин приобретает *anti*- или *syn*-конформацию в зависимости от ориентации своей гликозидной связи и образует две водородные связи с соседним гуанином (N1 образует водородную связь с O6, а N2 с N7). ДНК способны образовывать G-quadruplex структуры, состоящие из 1–4 слоев при различных условиях. Множество исследований было проведено с целью установления топологического строения теломерных G-quadruplex структур. Было обнаружено, что в теломерах образуется устойчивая структура из трех G-quadruplex слоев, ориентированных «*anti-anti-syn-syn*» и соединенных ТТА-петлями по латеральным и диагональным направлениям. Такая структура образуется в присутствии иона Na^+ . Были

также обнаружены другие формы G-quadruplex в присутствии иона K^+ в специфических условиях [7].

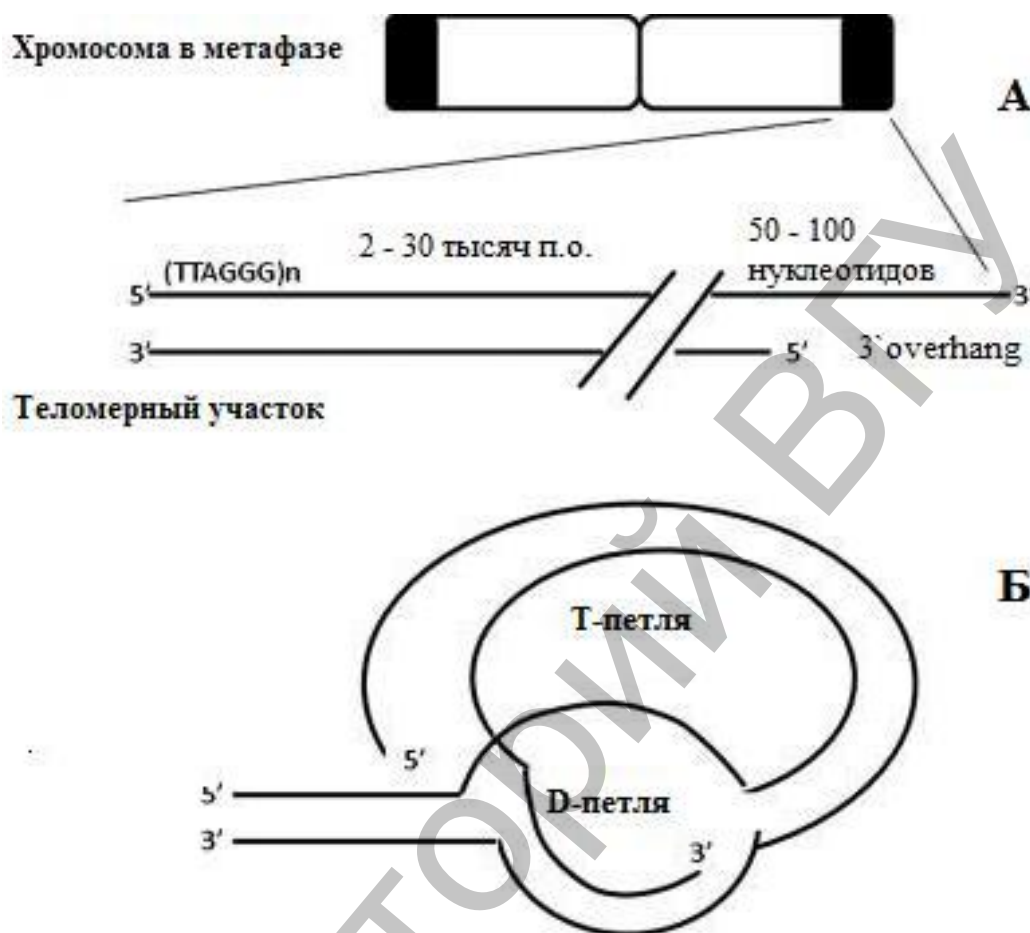


Рис. 7.2. Схематическое строение теломер. А – локализация теломер на концах хромосом; Б – схематический вид Т- и D-петель.

В клетке теломеры выполняют, по крайней мере, три важные функции.

1. Защита концов хромосом от ошибочного распознавания этого участка ДНК-репарационной системой как участка, содержащего ошибку или повреждение структуры сразу двух цепей. Полагают, что своей формой Т- и D-петли способствуют этому процессу.

2. Защита концов хромосом от ошибочной деградации белками.

3. Предотвращение слипания концов хромосом и случайного взаимодействия с комплементарными участками каких-либо других нуклеиновых кислот.

Несколько специфических белков образуют белковый комплекс *шелтерин* на теломерных повторах. Этот комплекс обеспечивает надлежащее функционирование теломер. Удаление этих белков вызывает дисфункцию теломер и активацию клеточного ответа на повреждение ДНК – запуск

сигнальных механизмов (преимущественно протеиновых киназ), конечным результатом действия которых является активация белка p53. Активация p53 (Protein 53) направлена на запуск механизмов клеточного старения и апоптоза с целью недопущения развития и размножения клеток с генетическими повреждениями.

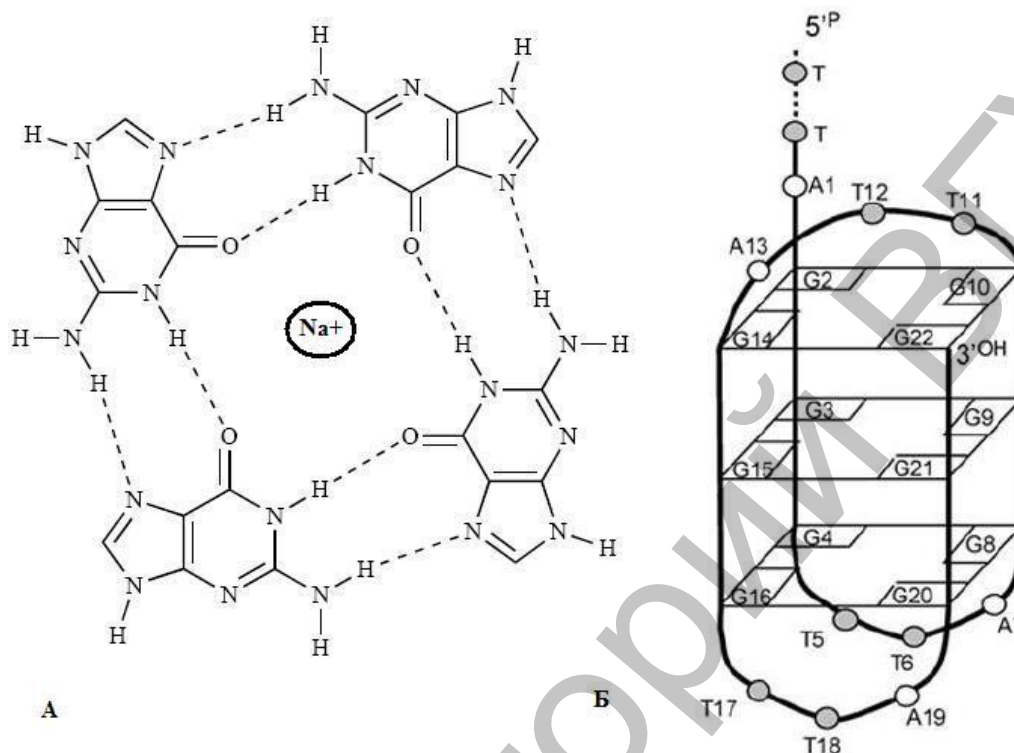


Рис. 7.3. Структура теломерной G-quadruplex структуры. А – 4 гуаниновых основания, связанные хугстиновскими водородными связями; Б – структура теломерной G-quadruplex структуры.

Шесть белков шелтеринового комплекса взаимодействуют с теломерными повторами (рис. 7.4).

TRF1 (telomere repeat binding factor 1) – белок, содержащий С-концевой Myb-домен, который взаимодействует с теломерной последовательностью, и N-концевой домен с кислотными свойствами. TRF2 имеет схожую структуру, но содержит N-концевой домен с основными свойствами. TRF1 имеет сродство к двойной теломерной ДНК приблизительно в 4 раза большую, чем TRF2. Белок POT1 (protection of telomerase 1) – белок, имеющий сродство к одноцепочечной ДНК 3'overhang из-за присутствия в его молекуле специфических ОБ-доменов (oligonucleotide binding domain). POT1 также взаимодействует с белками TRF1 и TRF2 опосредованно через белок TPP1 (telomere protection protein 1) и TIN2 (TRF1 interacting nuclear protein 2), который также связывается с TRF1 и TRF2. Белок RAP1 (repressor-activator protein 1) содержит Myb-домен, взаимодействующий с двойной теломерной ДНК, и домен для взаимодействия с TRF2 [8].

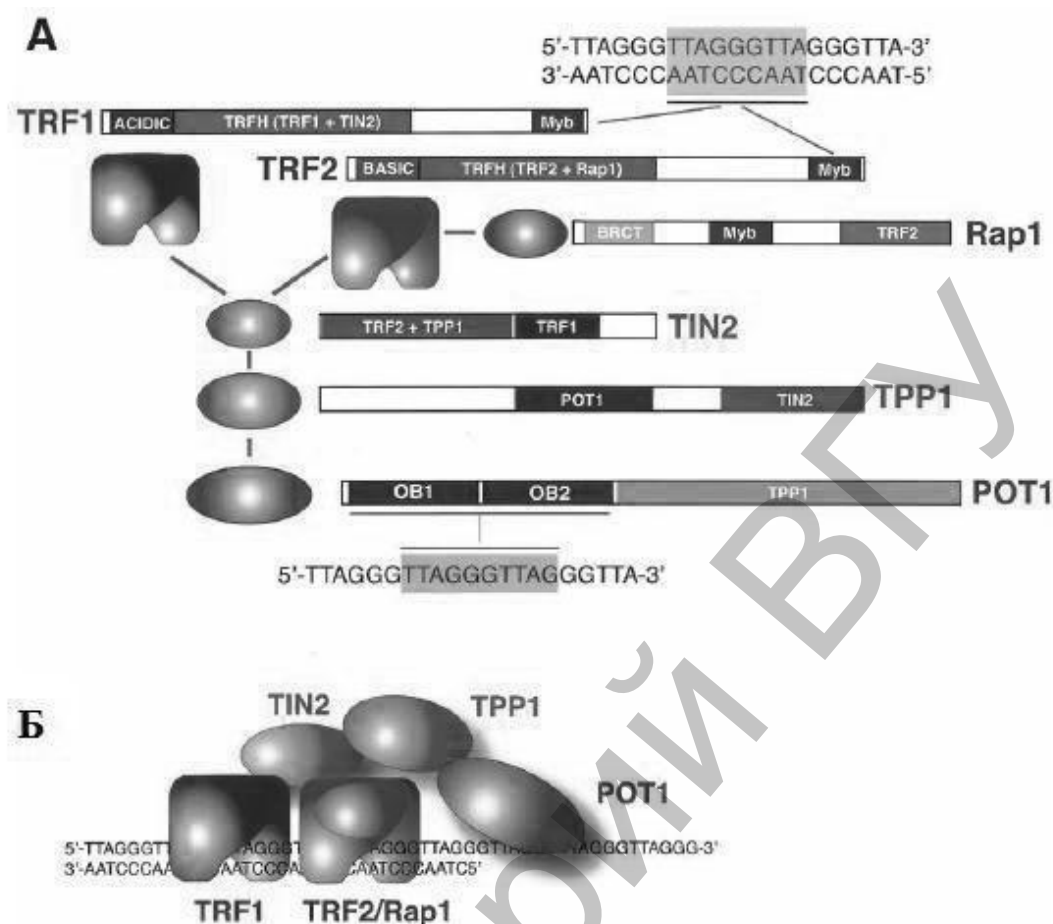


Рис. 7.4. Белки шелтеринового комплекса. А – доменное строение белков и их взаимодействие с другими белками и ДНК; Б – шелтериновый комплекс на теломерной ДНК.

Шелтериновый комплекс участвует в образовании 3'overhang (рис. 7.5 А).

После процесса репликации 5'-конец каждой хромосомы подвергается действию неизвестной нуклеазы, которая последовательно отщепляет нуклеотиды до встречи с последовательностью 5'-АТС. Таким образом на 3'-конце комплементарной цепи образуется участок для взаимодействия с POT1. При отсутствии белка POT1 нуклеазная активность либо отсутствует, либо образует дефектный 3'overhang, который вызывает негомологичное присоединение к концам теломер других спонтанных нуклеиновых фрагментов, теломер-теломерные взаимодействия и, в конечном итоге, хромосомную дестабилизацию.

Шелтериновый комплекс также участвует в образовании Т- и D-петель (рис. 7.5 Б). Был предложен механизм, согласно которому с одним 3'overhang могут связываться белки POT1 сразу от нескольких шелтериновых комплексов, что вызывает поворот конца хромосомы на 180°. Далее POT1 взаимодействует с 3'-цепью на дуплексном участке теломерной

A

TTAGGG)n
[AATCCC)n

ss [TTAGGG)n

5' 3'

Неизвестная нуклеаза

POT1

5'-TTAGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG..
3'-AATCCCAATCCCAATC_{5'}

B

T-петля

D-петля

В

I

II

Теломераза

Теломераза

Рис. 7.5. Функционирование шелтеринового комплекса. А – участие в образовании 3'overhang; Б – участие в образовании Т- и D-петель; В – участие в регуляции синтеза теломер теломеразой; I – длинные теломеры, большее количество шелтерина, недоступный для теломеразы 3'overhang; II – короткий теломер, малое количество шелтерина, 3'overhang, доступный для теломеразы.

Было установлено, что шелтериновый комплекс принимает участие в регуляции синтеза длины теломер теломеразой (см. ниже). Поскольку количество шелтерина пропорционально количеству теломерных повторов, то при достаточной длине теломер количество белка POT1 является достаточным для стабилизации теломерного комплекса. 3'overhang в данном случае жестко фиксирован и недоступен для присоединения к нему теломеразы. В случае, когда длина теломер сокращается до критических значений, количество шелтерина, а, следовательно, и количество POT1, связан-

ного с 3'overhang, также сокращается. Недостаточное количество шелтеринновых комплексов на теломерных повторах приводит к дестабилизации теломер и 3'overhang приобретает более доступное для теломеразы состояние (рис. 7.5 В) [10].

2. Механизм репликативного старения и злокачественная трансформация клеток

Длина теломер уменьшается при каждом цикле репликации, поэтому клетки способны делиться лишь ограниченное число раз. Укорочение длины теломер вызывает переход клеток в состояние «репликативного старения» (стадия M1 – mortality stage 1), при котором наблюдается замедление или полная остановка пролиферации, но клетки остаются живыми и поддерживают активный метаболизм. Изменение структуры теломер при достижении минимальной критической длины вызывает потерю основных функций теломер и запуск механизмов системы ответа на повреждение ДНК, конечным итогом которой является активация апоптоза. Некоторым клеткам все же удается преодолеть этот период, например, в присутствии вирусных онкогенов, вызывающих потерю функций противоопухолевых белков p53 и Rb (Retinoblastoma). Теломеры таких клеток продолжают укорачиваться и окончательно теряют свою защитную функцию. Это ведет к хромосомной дестабилизации, сопровождающейся ингибированием пролиферации и вызывающей клеточную смерть. Такая стадия называется «кризисом» (стадия M2). Те немногие выжившие после стадии M2 клетки могут задействовать механизмы удлинения теломер и становятся бессмертными, что наряду с другими изменениями является свидетельством злокачественной трансформации (рис. 7.6) [11].

Хотя для соматических клеток укорочение теломер и репликативное старение является обычным явлением, недостаточная длина теломер является причиной преждевременного старения на клеточном и организменном уровне. Заболевания, связанные с нарушениями функций теломер, зачастую являются результатом дисфункции теломеразы. Так, дисфункция теломеразы является причиной такого заболевания, как врожденный дискератоз (*dyskeratosis congenita*) – наследственное заболевание кожи с пойкилодермией, лейкоплакией слизистой оболочки рта, дистрофией ногтей, ладонно-подошвенным гипергидрозом, закупоркой или атрезией слезно-носовых каналов и прогрессирующей анапластической анемией. Различают X-сцепленную форму, проявляющуюся при мутациях дискерина, нарушающих сборку теломеразного комплекса, и аутосомальную доминантную форму, являющуюся результатом мутации в молекуле hTR.

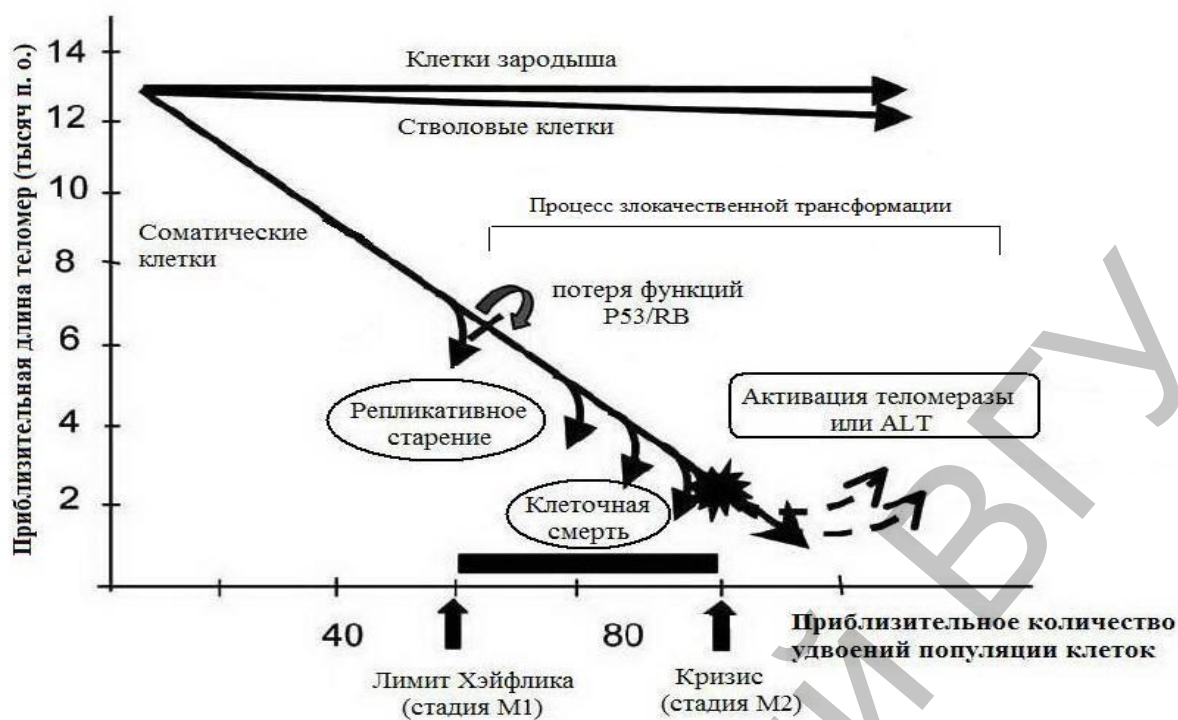


Рис. 7.6. Динамика длины теломер в нормальных клетках и при злокачественной трансформации.

Обе эти мутации вызывают недостаточную ТА в стволовых клетках и, как следствие, недостаточную длину теломер в соматических клетках. Изучение патогенеза легочного фиброза показало, что некоторые случаи наследственной формы этого заболевания связаны с мутациями в гене *hTERT* и укороченными теломерами [12].

Мутации теломерных белков, вызывающих хромосомную нестабильность, являются причиной синдрома преждевременного старения (*premature ageing syndromes*). Вероятно, что укороченные до критической длины теломеры вносят важный вклад в развитие таких заболеваний, как атаксия-телеангиэктазия (*ataxia-telangiectasia*), синдром Вернера (*Werner syndrom*), синдром Блума (*Bloom`s syndrom*) и синдром нарушения генетического кода Неймегена (*Nijmegen breakage syndrom*) [12].

СПИД и X-сцепленный лимфопролиферативный синдром (X-linked Lymphoproliferative Syndrom, XLT) являются заболеваниями, при которых дисфункция теломер вторична. «Эрозия теломер» в данных случаях наступает из-за увеличенной пролиферативной активности Т-клеток. В случае ВИЧ-инфекции пролиферация Т-клеток усиливается постоянным воздействием вирусного антигена. Проллиферация лимфоцитов при XLT увеличивается из-за действия дефектного белка SAP (SLAM Associated Protein), при-

нимающего участие в проведении сигнала Т-клеточных рецепторов и вызывающего активацию процессов клеточной гибели [13].

Атеросклероз – комплексное аутоиммунное и воспалительное заболевание, при котором массивное изменение клеток и гиперпластические процессы вызывают увеличение скорости укорочения теломер. Клетки с укороченными теломерами обнаруживаются в атеросклеротических бляшках [14].

3. Механизмы увеличения длины теломер

Нормальные клетки зародыша, эмбриональные и другие стволовые клетки, гематопоезические клетки, активированные лимфоциты, клетки базального слоя кожи, волосные фолликулы, клетки тонкого кишечника, а также бессмертные опухолевые клетки способны поддерживать длину теломер. Все бессмертные нормальные и 85–90% раковых клеток поддерживают длину теломер, задействуя белковый комплекс теломеразу [15].

Теломераза – высокомолекулярный (около 1000 kDa у позвоночных) нуклеопротеиновый комплекс, синтезирующий теломерные повторы на концах хромосом. Теломераза состоит из РНК-компонента и белковых субъединиц (рис. 7.7).

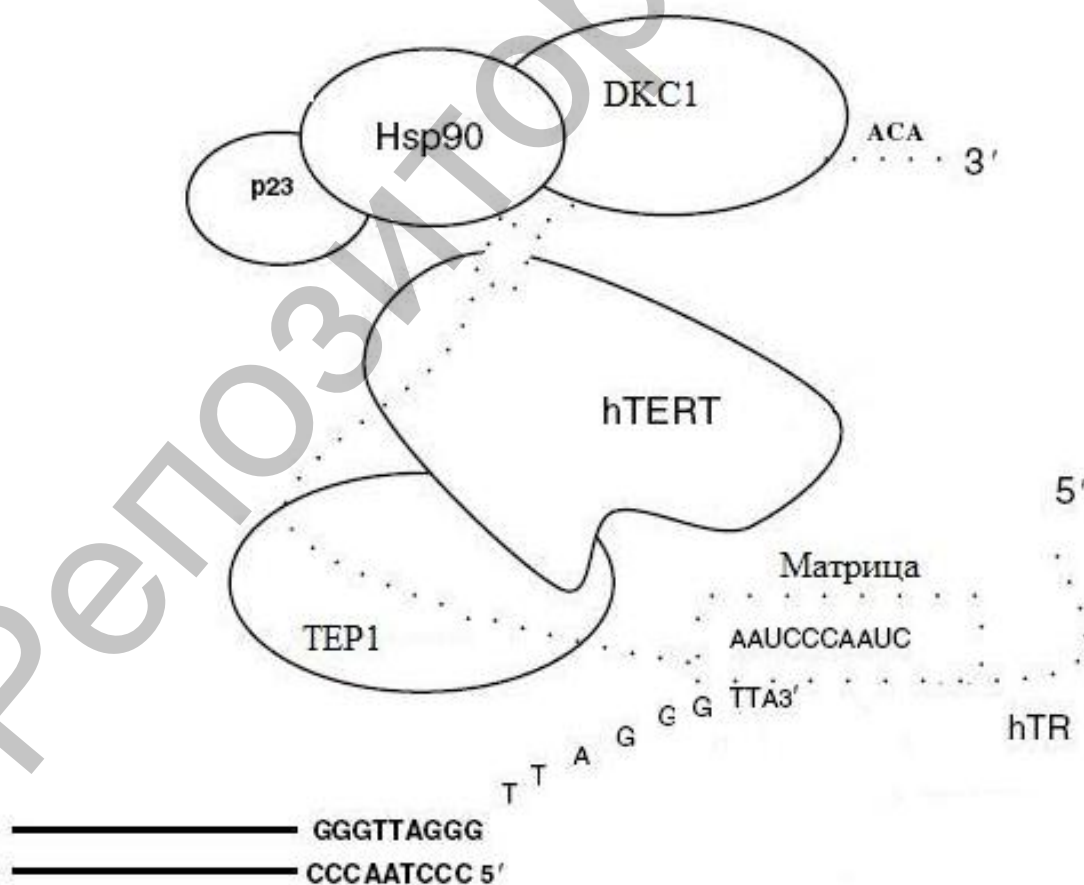


Рис. 7.7. Схематическое строение и механизм действия теломеразного комплекса.

hTR (human telomerase РНК) – компонент теломеразного комплекса, выполняет роль РНК-матрицы для синтеза теломерных повторов. hTR относится к семейству Н/АСА некодирующих РНК и локализована в клетке в тельцах Кахаля (Cajal bodies). hTR человека имеет длину 445 нуклеотидов и содержит матричный участок (5`-CUAACCCUAAC-3`), с которого происходит непосредственный синтез теломерных повторов [16].

hTERT (human telomerase reverse transcriptase) – каталитическая субъединица теломеразного комплекса, синтезирующая теломерные повторы на матрице hTR. Ген *hTERT* имеет 16 экзонов и в геноме человека представлен единственной копией, однако во многих первичных опухолях и опухолевых линиях человека наблюдается амплификация этого гена.

Промотор гена *hTERT* имеет сложное строение и регулируется множеством факторов. Явление «молчания» гена *hTERT* связывают с метилированием CpG островков в промоторной области. После транскрипции мРНК hTERT подвергается альтернативному сплайсингу с образованием различных вариантов. Однако только полноразмерный вариант hTERT обладает каталитической активностью. Молекула белка hTERT (127 кДа) содержит специфический транскриптазный домен на С-конце молекулы и обладает всеми свойствами, характерными для обратных транскриптаз. Регуляция активности hTERT осуществляется различными посттрансляционными механизмами. Активация функций hTERT происходит путем фосфорилирования/дефосфорилирования. Преремещение hTERT из цитоплазмы в ядро осуществляется белками семейства 14-3-3. Молекулярные шапероны HSP90 и HSP70 способствуют присоединению hTERT к другим компонентам теломеразного комплекса [16].

Белок теплового шока HSP90 (heat shock protein 90 kDa) и P23 (protein 23), входящие в состав теломеразного комплекса, как полагают, принимают участие в сборке и поддержании структуры теломеразного комплекса [16].

Дискерин (dyskerin, DKC1 – dyskeratosis congenita) – компонент теломеразного комплекса, который участвует во взаимодействиях между hTR, hTERT и ДНК, а также обеспечивает локализацию hTR и, возможно, всего теломеразного комплекса в тельцах Кахаля [16].

Последний из главных компонентов теломеразы – белок TEP1 (telomerase-associated protein 1), как полагают, обеспечивает правильную конформацию теломеразы, опосредуя взаимодействия между основными ее компонентами [16].

Следует заметить, что в раковых клетках теломераза не восстанавливает теломеры до длины, характерной для нормальных клеток, а постоянно поддерживает ее на уровне, достаточной для неограниченной пролиферации.

Некоторые типы раковых клеток используют отличный от теломеразного механизм поддержания длины теломер – ALT (alternate lengthening of telomeres), основанный на ДНК-зависимом синтезе ДНК, т.е. на обычной репликации, либо на нерецепируемом синтезе гомологичных участков хромосом. Общепринятой моделью ALT является модель, включающая механизм репликации теломер на матрице сестринской ДНК при участии специфических белков APB (ALT-associated promyelocytic bodies) [9]. Однако точные механизмы, лежащие в основе ALT, неизвестны. Предполагают, что путь ALT используется клетками в том случае, если невозможно задействовать теломеразу. В большинстве клеток удлинение теломер происходит только по одному из этих механизмов и путь ALT не активен в клетках с активной теломеразой, что говорит о существовании механизмов регуляции данных процессов. Линии клеток с ALT характеризуются одновременным отсутствием детектируемой теломеразной активностью и наличием теломер весьма различной длины – от весьма коротких до значительно превышающих нормальную длину. Однако существуют некоторые клеточные линии, в которых задействуются оба пути удлинения теломер [8].

4. Методы терапевтического воздействия на теломеры и теломеразу

Поскольку уменьшение длины и нарушение структуры теломер в клетках вызывает ингибирование пролиферации и активацию процессов клеточной смерти, разработке методов воздействия на теломеры и теломеразу в целях противоопухолевого терапевтического применения посвящено большое количество исследований.

Согласно данным о репликативном старении хромосом, антипролиферативное действие ингибитора теломеразной активности наступает при достижении критической длины теломер. Это подтверждается тем фактом, что в присутствии ингибиторов теломеразная активность в клетках 36М с длиной теломер 5–7 kb кризис наступает через 30–40 дней, в клетках LoVo с длиной теломер 2–3 kb – через 12–20 дней, а в клетках с очень короткими теломерами – через 3–7 дней [19].

Ингибирование функций теломеразы. Одним из наиболее распространенных методов управления экспрессией любых генов, в том числе генов *hTERT* и *hTR*, является применение антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных РНК данных генов.

Противоопухолевые препараты на основе нуклеиновых кислот представляют собой высокоспецифичный инструмент модуляции экспрессии генов и давно привлекают внимание исследователей в качестве регулято-

ров канцерогенеза на молекулярном уровне. Подавление ряда генов, аномально высокая экспрессия которых возникает при неопластической трансформации, можно осуществить с помощью препаратов на основе нуклеиновых кислот. В общем, механизм подавления экспрессии генов под действием этих препаратов заключается в их комплементарном связывании с РНК-мишенью, после чего целевая РНК либо расщепляется внутриклеточной РНКазой, либо блокируется процесс ее трансляции, так как образование гибридного комплекса препятствует продвижению рибосомы по мРНК.

Ингибирование теломеразной активности достигается снижением синтеза hTERT при воздействии антисмысловых нуклеотидов на ее mRNA или количества hTR. Для этой цели применяются синтетические нуклеиновые кислоты на основе DNA-олигонуклеотидов (ODNs – oligodeoxynucleotides), длиной 15–20 нуклеотидов (рис. 7.8).

Несмотря на эти недостатки, значительно ограничивающие применение ODNs в клинической практике, их использование внесло значительный вклад в понимание функций hTERT и hTR в различных экспериментальных моделях. Химические модификации ODNs позволили создать олигомеры с улучшенными терапевтическими свойствами. Так было создано несколько поколений модифицированных антисмысловых ODNs.

Олигомеры фосфоротиоатов (ОФТ) представляют собой первое поколение модифицированных ODNs, проходящих клинические испытания. В молекуле ОФТ один из атомов кислорода фосфодиэфирной связи заменен атомом серы. Такая замена делает данные соединения более устойчивыми к действию нуклеаз. Основным недостатком этих соединений является их неспецифическое взаимодействие с различными белками, что снижает их активность [21].

Второе поколение ингибиторных олигонуклеотидов представляют олигомеры РНК, содержащие нуклеотиды с алкильными заместителями в 2'-положении рибозных остатков. Наибольшее число исследований проводится с 2'-О-метил и 2'-О-метоксиметил олигонуклеотидами. Эти олигомеры менее токсичны, более стабильны и обладают большей аффинностью к объектам своего воздействия, по сравнению с ОФТ и ODNs. Однако 2'-О-алкильные олигомеры не вызывают активации РНКазы H, а ингибирование ТА является результатом ингибирования транскрипции hTERT и hTR [22]. 2',5'-олигоаденилатные антисмысловые олигомеры представляют собой химерные олигомеры, состоящие из антисмысловой части, соединенной с олигоаденилатными атомами – медиаторами интерферонового сигнального каскада на 2' и 5'-концах молекулы. Такая модификация по-

зволяет олигомерам подвергаться специфической деградации РНК hTR и hTERT при помощи РНКазы L [23].

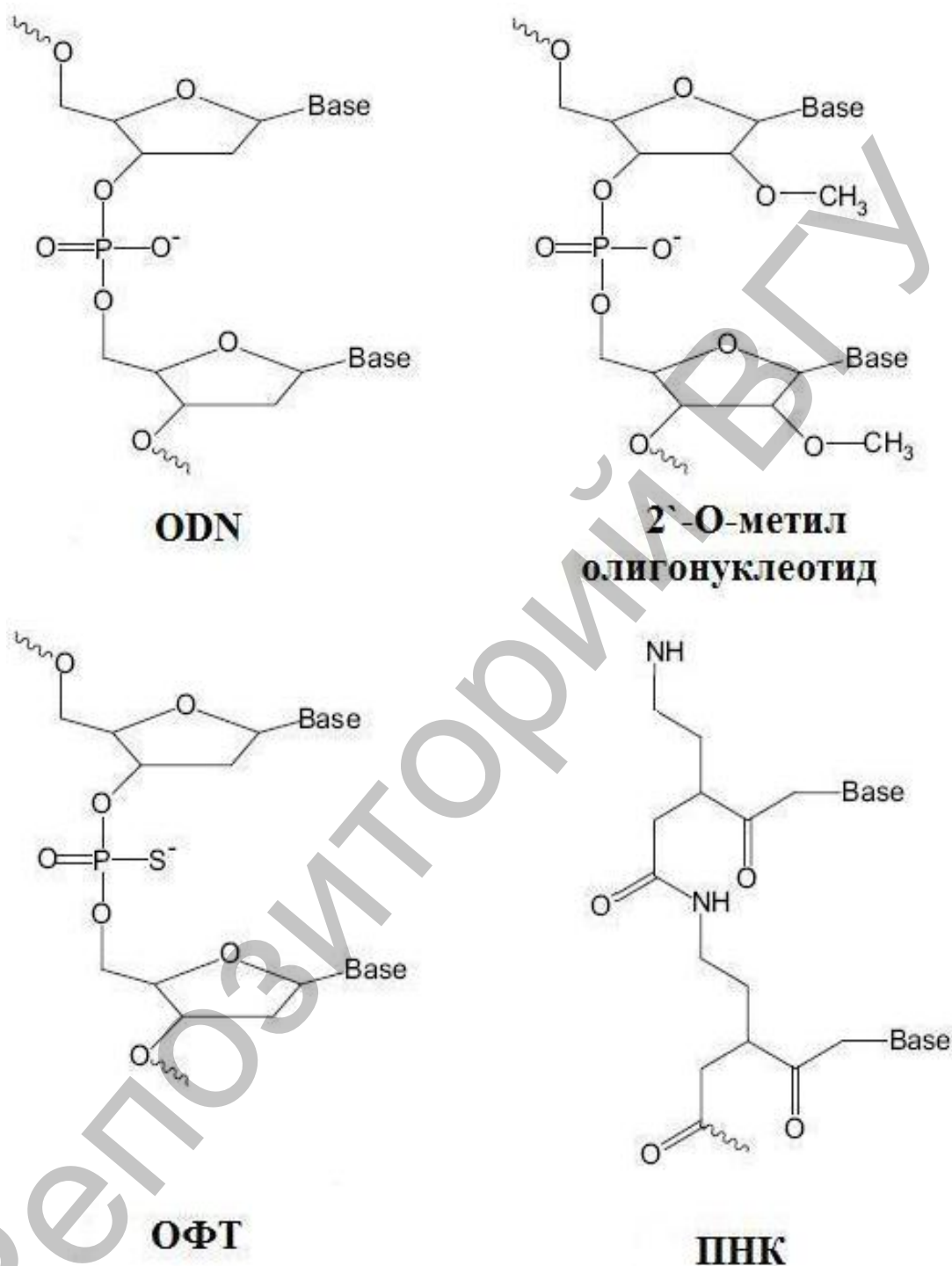


Рис. 7.8. Антисмысловые олигонуклеотиды.

Показано, что ODNs, действуя вышеуказанным образом, способны ингибировать пролиферацию клеток рака крови *in vitro* [20]. Однако их применение значительно осложняется плохой способностью проникновения в клетку и инактивацией внутриклеточными нуклеазами.

Пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) относятся к третьему поколению антисмысловых олигонуклеотидов. В ПНК фосфатный остов заменен на псевдопептидную связь, состоящую из N-(2-аминометил)глициновых частиц. Незаряженная структура остова ПНК увеличивает стабильность комплексов ПНК с нуклеиновыми кислотами к действию протеаз и нуклеаз. Хотя действие ПНК не вызывает активацию РНКазы H, они эффективно ингибируют транскрипцию гена *hTR*. Отсутствие заряда на молекулах ПНК делает затруднительным их проникновение в клетку. Для этой цели были предложены методы клеточной электропорации и химерные конструкции ПНК с «внедряющими» катионными липидами [24]. Другим методом внедрения ПНК в клетку является их конъюгация с Antennapedia внедряющим пептидом, содержащим большое количество цистеина [25]. Наиболее успешным методом внедрения ПНК в клетку является метод фотохимической интернализации [26]. N3'-P5' фосфорамидаты, как и ПНК, принадлежат к третьему поколению антисмысловых олигонуклеотидов. Они содержат модифицированный фосфатный остов, в котором 3'-ОН группа рибозы замещена NH₂-группой. Такая модификация придает этим олигомерам высокую РНК-связывающую активность и устойчивость к действию нуклеаз [27].

Поскольку hTERT обладает обратнo-транскриптазной активностью и содержит каталитический домен, свойственный всем известным обратным транскриптазам, было продемонстрировано, что большинство ингибиторов обратных транскриптаз способны, в той или иной степени, ингибировать функции hTERT [28].

Множество работ посвящено поиску специфических ингибиторов функций hTERT, результатом которых явилось открытие нескольких активных соединений (рис. 7.9).

Наиболее изученными и постепенно входящими в клиническую практику соединениями являются TMPI (2-[3-trifluoromethylphenyl]isothiazolin-3-one), взаимодействующий с остатками цистеина в молекуле hTERT [29], рубромицин β и γ , являющиеся конкурентными ингибиторами по отношению к теломерному субстрату [30], BIBR1532, взаимодействующий с участком, отличным от активного центра hTERT, но нарушающий его конформацию [31], а также соединения TNQX (2,3,7-trichloro-5-nitroquinoxaline) [32], U-73122 [33] и биофлаваноид хеленин [34] с неустановленными механизмами действия.

hTERT является фосфопротеидом, чья активность регулируется комплексом протеиновых киназ. PKC (protein kinase C) – серин/треониновая киназа активирует hTERT посредством фосфорилирования. Ингибитор

РКС bis-indolylmaleimide I и H-7 вызывает ингибирование теломеразной активности [35]. РКВ (protein kinase B) или Akt также способна фосфорилировать hTERT. Обработка раковых клеток ингибитором PI3-киназы – вортманнином (Wortmannin) – вызывает ингибирование фосфорилирования hTERT и теломеразной активности [36]. PP2A (protein phosphatase 2A) вызывает дефосфорилирование hTERT и ингибирование теломеразной активности [37].

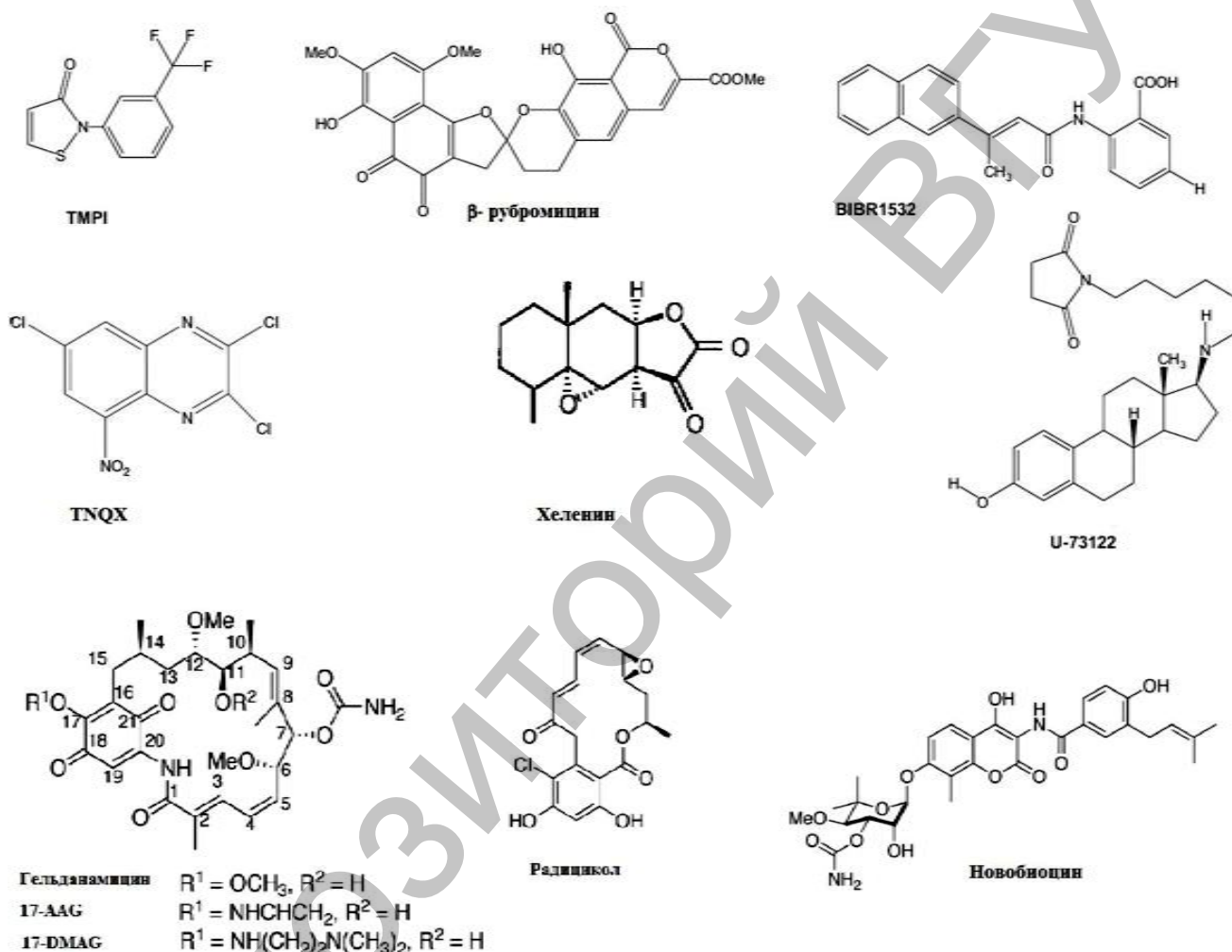


Рис. 7.9. Ненуклеозидные ингибиторы теломеразы.

Обработка раковых клеток ингибитором протеиновых фосфатаз акадаикой кислотой (akadaic acid) вызывает активацию процессов фосфорилирования hTERT и увеличения ТА. Однако ингибирование активности hTERT посредством воздействия на РКС, Akt и PP2A вызывает изменение в активностных состояниях многих других клеточных белков, способствуя появлению нежелательных клеточных реакций [35].

Воздействие на функции HSP90 также является привлекательной стратегией ингибирования теломеразной активности. Существует несколь-

ко классов ингибиторов функций HSP90, наиболее изученными из которых являются гелданамицин и его аналоги (17-AAG и 17-DMAG), радицикол и новобиоцин [38]. Ингибирование HSP90 вызывает блокирование внутриклеточной сборки активной формы теломеразного комплекса. Использование гелданамицина вызывает лишь частичное снижение ТА и ингибирование внутриклеточных функций HSP90. Влияния ингибиторов HSP90 на ТА в клеточных экстрактах с уже активной теломеразой не выявлено [39]. Ингибирование HSP90 в составе теломеразного комплекса сопряжено с проявлением множества негативных побочных эффектов, поскольку HSP90 участвует во множестве других биологических процессов.

Токсичность препаратов, ингибирующих теломеразную активность, для нормальных клеток с активной теломеразой является главной проблемой их терапевтического применения. Некоторые наблюдения указывают на то, что такая токсичность может успешно преодолеваться нормальными клетками за счет того, что нормальные клетки, по сравнению с раковыми, имеют большую длину теломер, необходимую для длительной пролиферации, и делятся значительно реже. Следовательно, критическая длина теломер наступает раньше в раковых клетках.

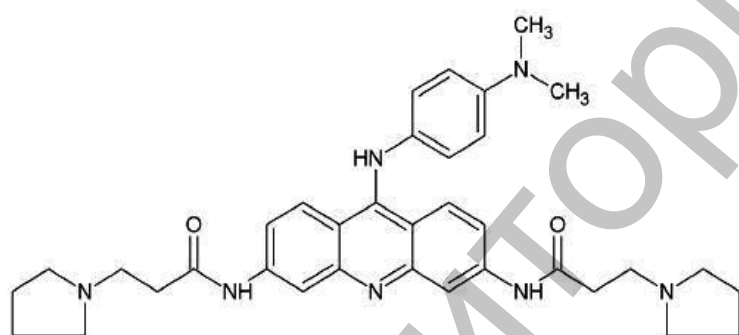
Существует также гипотеза о том, что длительное использование агентов, вызывающих ингибирование теломеразной активности, способствует селекции мутантных клеток и их клонов, устойчивых к действию данных препаратов и удлиняющих теломеры при помощи механизма ALT. С целью терапевтического воздействия на клетки, использующие механизм ALT, применяются ингибиторы функций теломер.

Ингибирование функций теломер. Стратегия ингибирования функций теломер основывается на применении соединений, специфически связывающихся с G-quadruplex теломерными структурами и вызывающих их стабилизацию при взаимодействии с гуанинами с одного или сразу двух концов в цепи ДНК. Такая стабилизация блокирует возможность доступа теломеразы к концам хромосом и диссоциацию связанных с теломерами белков, что ведет, в конечном итоге, к активации механизмов апоптоза. Все соединения с подобным механизмом действия основаны на веществах, интеркалирующих в двойную цепь (производные акридинов, катионных порфиринов, триазины, антрахиноны, перилены). Поэтому при их использовании возникают неспецифические цитотоксические реакции. Понимание механизмов действия таких препаратов является основой для создания более специфичных терапевтических ингибиторов функций теломер [40]. Наиболее изученными соединениями, обладающими подобным действием, являются следующие (рис. 7.10).

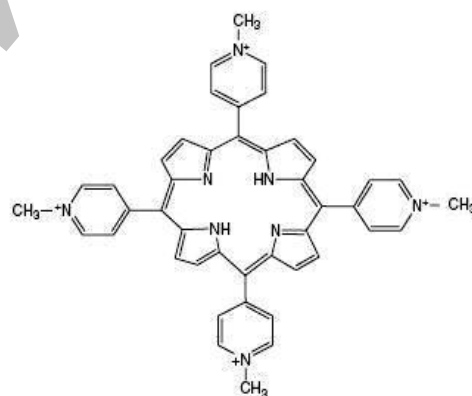
BRACO-19 – соединение на основе акридина, содержащее 3 ароматических кольца с функциональными группами, обеспечивающими взаимодействие с G-quadruplex. Действие BRACO-19 вызывает потерю защитных функций теломер, при этом происходят неспецифическое соединение концов хромосом и активация механизмов ответа на повреждение ДНК [40].

TMPyP4 (tetra(N-methyl)-4-pyridiyl)porphyrin) – соединение, содержащее 4 порфириновых кольца, взаимодействующих с 4-мя гуанинами, и катионную группу N-пиримидина, интерколирующую между слоями G-quadruplex [41].

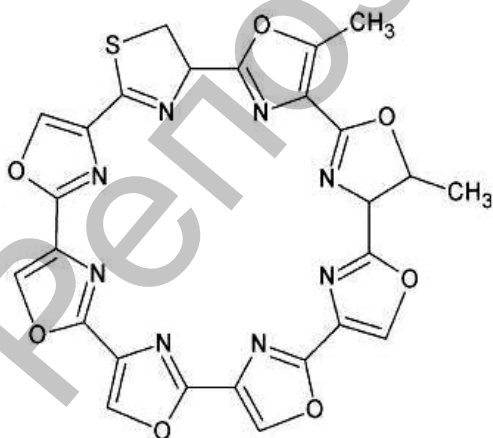
Теломестатин (telomestatin) – природный компонент, получаемый из *Streptomyces anulatus*. В раковых клетках теломестатин вызывает конформационную дестабилизацию 3'-overhang, ингибируя присоединение к нему белка POT1 и вызывая диссоциацию комплексов TRF2 и теломер. Теломестатин вызывает дестабилизацию концевых участков теломер, что приводит к некомплементарному присоединению концов хромосом друг к другу и деградации 3'-overhang [42].



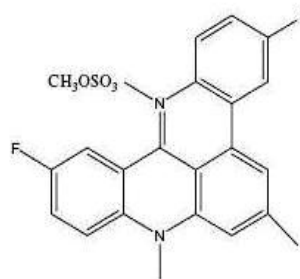
BRACO19



TMPyP4



Теломестатин



RHPS4

Рис. 7.10. Ингибиторы функций теломер.

Соединение RHPS4 ($IC_{50} = 0,33$ мкМ) – пентациклический акридин также вызывает дисфункцию теломер в виде некомплементарного соединения концов хромосом в некоторых линиях клеток меланомы человека [43].

Некоторые гуаниновые аналоги, такие, как клинически активный противоопухолевый препарат 6-меркаптопурин, способны предотвращать образование G-quadruplex структур на концах хромосом *in vitro* [44].

G-quadruplex участки широко встречаются в геноме в промоторных областях многих генов. Более того, теломероподобные последовательности с различным количеством TTAGGG повторов встречаются и внутри хромосом. Молекулы РНК, содержащие большое количество гуанина, также способны образовывать G-quadruplex. Поэтому молекулы, стабилизирующие G-quadruplex структуры, при взаимодействии с такими участками вызывают появление неспецифических цитотоксических эффектов в нормальных клетках.

Следует иметь в виду, что все вещества, взаимодействующие с отличными от теломерных G-quadruplex структур, теоретически способны ингибировать функционирование теломер, однако не все из них охарактеризованы в этом отношении.

5. Лабораторное определение теломеразной активности

Определение активности теломеразы в тканях является одним из способов определения степени ее злокачественности. Применение метода TRAP (telomeric repeat amplification protocol) позволяет выявлять даже самую слабую теломеразную активность. Данный метод основан на автордиографическом детектировании продуктов теломеразной активности. Однако высокая чувствительность данного метода является причиной ложноположительных результатов. Причиной этому является наличие среди обычных соматических небольшого количества стволовых клеток, обладающих теломеразной активностью. С целью увеличения диагностической ценности метода TRAP Kim и соавторы разработали модифицированный метод, обладающий меньшей чувствительностью и позволяющий выявлять теломеразную активность, характерную для раковых клеток [45]. Данный метод не требует специального оборудования для работы с радиоактивными метками, что делает его более доступным.

Данная методика основана на ПЦР-амплификации продуктов теломеразной реакции, полученных при удлинении ферментом специфического праймера (рис. 7.11 А).

К лизированным клеткам добавляется TS-праймер – искусственный аналог теломер. Теломераза, содержащаяся в клеточных лизатах, увеличивает длину данного праймера до различных значений. Увеличение количе-

ства продуктов теломеразной активности, синтезированных теломерных повторов на TS-праймере осуществляется методом ПЦР с использованием СХ-праймера, комплементарного теломерным повторам и части TS-праймера. Детектирование продуктов амплификации осуществляется после электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и окрашивания высокочувствительным красителем SYBR Green I. Визуализация осуществляется в ультрафиолетовом свете (λ 254 нм).

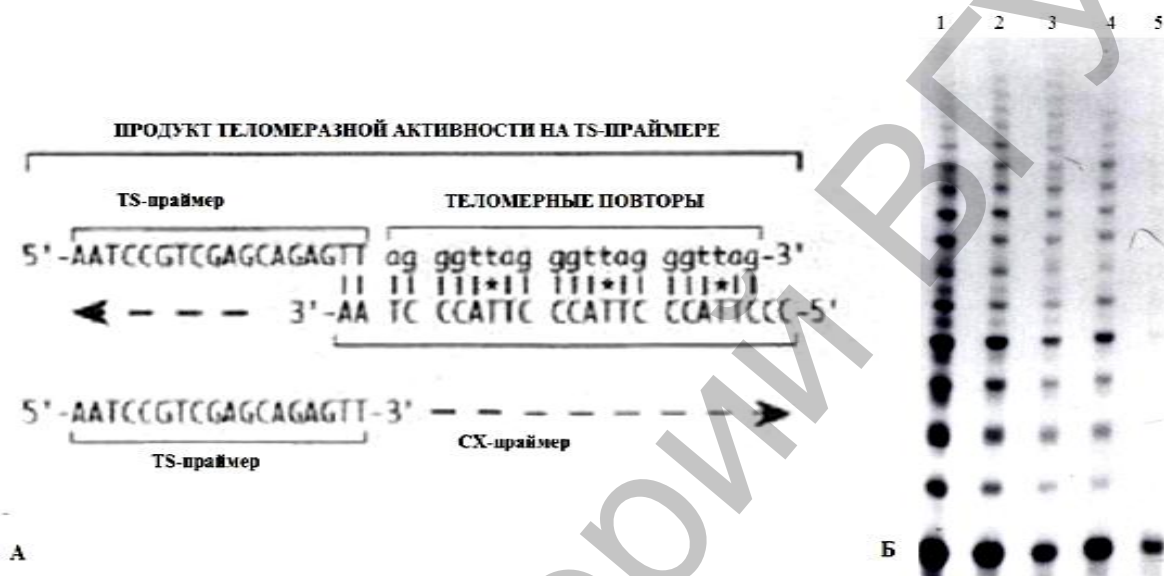


Рис. 7.11. Продукт теломеразной активности. А – принцип модифицированного метода TRAP; Б – продукты теломеразной активности после визуализации на ПААГ, 1 – положительный контроль, 2–4 – различная степень теломеразной активности, 5 – отрицательный контроль.

Продукт теломеразной активности на ПААГ представляет собой «лестницу» дискретных полос с интервалом 6 пар оснований, т.е. с интервалом в один теломерный повтор (рис. 7.11 Б). Степень активности теломеразы в изучаемых клетках или тканях определяют по интенсивности полос по отношению к положительному (активность теломеразы в стандартных линиях раковых клеток) и отрицательному (инактивированная нагреванием теломераза) контролю.

Лабораторная работа

Определение теломеразной активности

Необходимое оборудование: лабораторная посуда для приготовления реактивов, одноразовые ПЦР пробирки на 0,5 мл, автоматические пипетки, весы, магнитная мешалка, рН-метр, центрифуга, камера для ПААГ электрофореза, ПЦР-амплификатор, УФ-трансиллюминатор.

Необходимые реактивы: H₂O деионизованная, Трис, Трис-НCl, H₃BO₃, MgCl₂, ЭДТА, ЭГТА, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), β-меркаптоэтанол, CHAPS (CHAPS), глицерин, (NH₄)₂SO₄, твин-20, дезоксинуклеотидтрифосфат (дезоксиаденозинтрифосфат, дезокситимидинтрифосфат, дезоксигуанозинтрифосфат и дезоксицитидинтрифосфат), TS-праймер (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), CX-праймер (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3'), Taq ДНК-полимераза, акриламид, bis-акриламид, персульфат аммония, TEMED, SYBR Green I.

Часть 1. Приготовление растворов.

1. Лизирующий буфер (требуется 10 мл): 10 mM Трис-НCl (pH 7,5), 1 mM MgCl₂, 1 mM ЭГТА; 0,1 mM PMSF, 5 mM β-меркаптоэтанол, 0,5% CHAPS и 10% глицерин.

2. Буфер для элонгации TS-праймера и ПЦР амплификации (требуется 10 мл): 67 mM Трис-НCl (pH 8,8), 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% твин-20, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM ЭГТА, 0,25 mM каждого дНТФ, 0,1 мкг TS-праймера.

3. Трис-борат-ЭДТА (ТБЭ-буфер, требуется 500 мл): 0,09M Трис, 0,09M H₃BO₃, 2mM ЭДТА, довести H₃BO₃ до pH = 8,3.

4. 12% ПААГ (требуется 10 мл.): 12% акриламид, 3% bis-акриламид, 300 мкл глицерина, 50 мкл 10% персульфата аммония, 8 мкл TEMED, довести ТБЭ-буфером до 10 мл. Данный буфер следует приготовить непосредственно перед использованием.

Часть 2. Проведение опыта.

1. Лизирование клеток.

К раковым клеткам (из доступной линии) добавить лизирующий буфер из расчета 1 мкл на 10³ клеток. Инкубировать на льду в течение 30 мин, пипетировать через каждые 5 мин. Центрифугировать гомогенат 20 мин при 4 °C и 10000 x g. Отобрать надосадочную жидкость и разбавить ее лизирующим буфером до эквивалента 2000 клеток.

2. Элонгация TS-праймера.

В 2 пробирку на 0,5 мл внести по 28 мкл буфера для элонгации и ПЦР амплификации и 2 мкл. клеточного лизата. Одну из пробирок нагреть до 96 °C в течение 10 мин для инактивации теломеразы. Данный образец будет служить отрицательным контролем. Далее обе пробирки инкубировать 30 мин при 37 °C и 10 мин при 96 °C для остановки реакции.

3. Амплификация продуктов теломеразной активности.

Добавить в пробирки по 0,1 мкг CX-праймера и 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы. Реакционную смесь подвергнуть ПЦР в следующем режиме: 94 °C – 2 мин; 30 циклов: 94 °C – 30 сек, 50 °C – 30 сек, 72 °C – 40 сек; 72 °C – 5 мин.

4. ПААГ электрофорез.

Залить 12% ПААГ в стекла камеры, для электрофореза оставить на 30 мин для полимеризации. Внести по 10 мкл реакционной смеси в лунки и провести электрофорез в течение 90 мин при 12 В/см.

5. Окрашивание ПААГ.

После электрофореза ПААГ инкубировать 20 мин в ТБЭ-буфере с 0,0001% SYBR Green I. Поместить гель в УФ-трансиллюминатор и проанализировать полученный результат.

В результате эксперимента на ПААГ в УФ свете должны быть видны продукты теломеразной активности в виде зеленых полос с периодичностью 6 пар оснований в пробе с активной теломеразой и отсутствие продуктов теломеразной активности в пробе с отрицательным контролем.

Контрольные вопросы

1. *Дайте определение понятиям «теломеры», «теломераза».*
2. *Каковы функции теломер?*
3. *Объясните строение теломерной G-quadruplex структуры.*
4. *Что такое шелтериновый комплекс?*
5. *Каков механизм репликативного старения и злокачественной трансформации клеток?*
6. *Объясните механизмы увеличения длины теломер.*
7. *Назовите методы воздействия на теломеры и теломеразу.*
8. *Опишите принцип метода оценки теломеразной активности.*

Литература

1. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains / L. Hayflick, P.S. Moorhead // Exp. Cell. Res. – 1961. – Vol. 25. – P. 585–621.
2. Olovnikov, A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon / A.M. Olovnikov // J. Theor. Biol. – 1973. – Vol. 41, N 1. – P. 181–190.
3. Blackburn, E.H. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena / E.H. Blackburn, J.G. Gall // J. Mol. Biol. – 1978. – Vol. 120, N 1. – P. 33–53.
4. Moyzis, R.K. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes / R.K. Moyzis [et. al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – Vol. 85, N 18. – P. 6622–6626.
5. Greider, C.W. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts / C.W. Greider, E.H. Blackburn // Cell. – 1985. – Vol. 43, N 2. – P. 405–413.

6. Griffith, J.D. Mammalian telomeres end in a large duplex loop / J.D. Griffith [et. al.] // Cell. – 1999. – Vol. 97, N 4. – P. 503–514.
7. Chen, B. G-quadruplex structure: a target for anticancer therapy and a probe for detection of potassium / B. Chen [et. al.] // Biochemistry (Mosc). – 2008. – Vol. 73, N 8. – P. 853–861.
8. Smogorzewska, A. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2 / A. Smogorzewska [et. al.] // Mol. Cell. Biol. – 2000. – Vol. 20, N 5. – P. 1659–1668.
9. De Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres / T. De Lange // Genes Dev. – 2005. – Vol. 19, N 18. – P. 2100–2110.
10. Loayza, D. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control / D. Loayza, T. De Lange // Nature. – 2003. – Vol. 423, N 6943. – P. 1013–1018.
11. Crabbe, L. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome / L. Crabbe [et. al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, N 7. – P. 2205–2210.
12. Plunkett, F.J. The impact of telomere erosion on memory CD8+ T cells in patients with X-linked lymphoproliferative syndrome / F.J. Plunkett [et. al.] // Mech. Ageing Dev. – 2005. – Vol. 126, N 8. – P. 855–865.
13. Fuster, J.J. Telomere biology and cardiovascular disease / J.J. Fuster [et. al.] // Circ. Res. – 2006. – Vol. 99, N 11. – P. 1167–1180.
14. Shay, J.W. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen / J.W. Shay [et. al.] // Exp. Cell. Res. – 1993. – Vol. 209, N 1. – P. 45–52.
15. Robart, A.R. Investigation of human telomerase holoenzyme assembly, activity, and processivity using disease-linked subunit variants / A.R. Robart, K. Collins // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, N 7. – P. 4375–4386.
16. Yi, X. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels / X. Yi [et. al.] // Mol. Cell. Biol. – 1999. – Vol. 19, N 6. – P. 3989–3997.
17. Hoare, S.F. Lack of telomerase RNA gene hTERC expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERC promoter / S.F. Hoare [et. al.] // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61, N 1. – P. 27–32.
18. Zhang, X. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells / X. Zhang // Genes Dev. – 1999. – Vol. 13, N 18. – P. 2388–2399.

19. Kraemer, K. Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells / K. Kraemer [et. al.] // Clin. Cancer Res. – 2003. – Vol. 9, N 10. – P. 3794–3800.
20. Pirollo, K.F. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice / K.F. Pirollo [et. al.] // Pharmacol. Ther. – 2003. – Vol. 99, N 1. – P. 55–77.
21. Elayadi, A.N. Inhibition of telomerase by 2'-O-(2-methoxyethyl) RNA oligomers: effect of length, phosphorothioate substitution and time inside cells / A.N. Elayadi // Nucleic Acids Res. – 2001. – Vol. 29, N 8. – P. 1683–1689.
22. Kondo S. Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA / S. Kondo // Oncogene. – 1998. – Vol. 16, N 25. – P. 3323–3330.
23. Shammass, M.A. Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells / M.A. Shammass [et. al.] // Oncogene. – 1999. – Vol. 18, N 46. – P. 6191–6200.
24. Villa, R. Inhibition of telomerase activity by a cell-penetrating peptide nucleic acid construct in human melanoma cells / R. Villa [et. al.] // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 473, N 2. – P. 241–248.
25. Berg, K. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol / K. Berg [et. al.] // Cancer Res. – 1999. – Vol. 59, N 6. – P. 1180–1183.
26. Pruzan, R. Allosteric inhibitors of telomerase: oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates / R. Pruzan [et. al.] // Nucleic Acids Res. – 2002. – Vol. 30, N 2. – P. 559–568.
27. Strahl, C. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines / C. Strahl, E.H. Blackburn // Mol. Cell. Biol. – 1996. – Vol. 16, N 1. – P. 53–65.
28. Hayakawa, N. Isothiazolone derivatives selectively inhibit telomerase from human and rat cancer cells in vitro / N. Hayakaw [et. al.] // Biochemistry. – 1999. – Vol. 38, N 35. – P. 11501–11507.
29. Ueno, T. Inhibition of human telomerase by rubromycins: implication of spiroketal system of the compounds as an active moiety / T. Ueno [et. al.] // Biochemistry. – 2000. – Vol. 39, N 20. – P. 5995–6002.
30. Damm, K. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation / K. Damm [et. al.] // EMBO J. – 2001. – Vol. 20, N 24. – P. 6958–6968.
31. Kim, J.H. Identification of a quinoxaline derivative that is a potent telomerase inhibitor leading to cellular senescence of human cancer cells / J.H. Kim [et. al.] // Biochem. J. – 2003. – Vol. 373, N 2. – P. 523–529.
32. Chen, Y.J. Potent inhibition of human telomerase by U-73122 / Y.J. Chen [et. al.] // J. Biomed. Sci. – 2006. – Vol. 13, N 5. – P. 667–674.

33. Huang, P.R. Potent inhibition of human telomerase by helenalin / P.R. Huang, Y.M. Yeh, T.C. Wang // *Cancer Lett.* – 2005. – Vol. 227, N 2. – P. 169–174.
34. Kraemer, K. Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells / K. Kraemer [et. al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9, N 10. – P. 3794–3800.
35. Li, H. Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells / H. Li [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, N 27. – P. 16729–16732.
36. Kang, S.S. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit / S.S. Kang [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, N 19. – P. 13085–13090.
37. Stravopodis, D.J. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex / D.J. Stravopodis, L.H. Margaritis, G.E. Voutsinas // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 14, N 29. – P. 3122–3138.
38. Holt, S.E. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes / S.E. Holt [et. al.] // *Genes Dev.* – 1999. – Vol. 13, N 7. – P. 817–826.
39. Burger, A.M. The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function / A.M. Burger [et. al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 4. – P. 1489–1496.
40. Siddiqui-Jain, A. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription / A. Siddiqui-Jain [et. al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2002. – Vol. 99, N 18. – P. 11593–11598.
41. Binz, N. Telomerase inhibition, telomere shortening, cell growth suppression and induction of apoptosis by telomestatin in childhood neuroblastoma cells / N. Binz [et. al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 41, N 18. – P. 2873–2881.
42. Leonetti, C. Biological activity of the G-quadruplex ligand RHPS4 (3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quino[4,3,2-kl]acridinium methosulfate) is associated with telomere capping alteration / C. Leonetti [et. al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 66, N 5. – P. 1138–1146.
43. Kang, S.S. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit / S.S. Kang [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, N 19. – P. 13085–13090.
44. Kim, N.W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer / N.W. Kim [et. al.] // *Science.* – 1994. – Vol. 266, N 5193. – P. 2011–2015.

ГЛАВА 8. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ШАПЕРОНЫ HSP70 И ИХ РОЛЬ В СОВРЕМЕННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Глава посвящена противоопухолевым вакцинам на основе белков теплового шока HSP70. В ней изложены некоторые аспекты иммунологии злокачественных новообразований и описаны методы работы с белками. В главе рассматриваются вопросы, связанные с поддержанием нативной структуры внутриклеточных белков.

Известно, что трехмерная конформация белка заложена на уровне его первичной структуры, то есть последовательности аминокислот. В качестве доказательства этого факта приводился довольно простой опыт: фермент бычья рибонуклеаза денатурировали путем восстановления и нагревания, а затем при охлаждении до комнатной температуры он вновь приобретал исходную конформацию и активность. Однако, накоплено достаточно фактов, ставящих под сомнение утверждение о детерминированности третичной структуры белка на уровне его пептидного остова. Вот некоторые из них:

1. Одной из рутинных задач современной биотехнологии является выработка рекомбинантных человеческих белков в бактериях *E.coli*. При этом высокий уровень продукции приводит к тому, что целевой белок накапливается в нерастворимом виде (тельца включения). Чтобы вернуть белку нативную конформацию приходится прибегать к различным манипуляциям: использовать восстановители (β -меркаптоэтанол), добавлять в среду полярные вещества (аргинин) и разбавлять белок до концентрации не более 0,1 мг/мл. Для сравнения приблизительная концентрация белка в клетках составляет около (!) 300 мг/мл.

2. На гистологических препаратах ряда нейродегенеративных заболеваний (болезни Паркинсона, Альцгеймера) можно заметить наличие белковых телец включения (например, тельца Леви). Белки, входящие в состав этих агрегатов, в большинстве случаев имеют нормальную первичную структуру.

3. Сейчас уже достаточно хорошо изучены так называемые прионы, молекулы белковой природы. Показано, что их первичная структура полностью соответствует нормальным клеточным белкам, но на более высоких уровнях организации структуры наблюдаются существенные изменения (увеличение числа β -складок и т.д.). Более того, взаимодействие прионного белка с нормальным приводит к превращению последнего в прионный белок.

Итак, ясно, что пример с рибонуклеазой – всего лишь один из немногих счастливых случаев самопроизвольной сборки белков. В настоящее время сформулирована концепция *ассистируемой самоорганизации*, которая предполагает, что хотя сворачивание белков является спонтанным процессом, но существуют критические стадии, на которых необходимо участие специфических факторов, получивших название «шапероны».

1. Разнообразие шаперонов

Участие шаперонов необходимо, главным образом, в двух случаях: во время посттрансляционной сборки белка и в период воздействия стрессовых факторов на клетку. Наиболее простым с точки зрения воспроизведения в лабораторных условиях стрессовым фактором является нагревание, поэтому защитные белки, экспрессия которых повышалась в ответ на резкое повышение температуры, так и называли – «белки теплового шока» – heat shock proteins (HSP). Оказалось удобным классифицировать и называть белки теплового шока по их молекулярной массе. В данной главе мы рассмотрим лишь некоторые семейства белков теплового шока: HSP70 kDa, HSP60 kDa, а также HSP с молекулярной массой около 40 kDa, входящие в состав двух основных типов шаперонных систем клетки. Следует отметить, что название «белок теплового шока» не совсем справедливо. Экспрессия некоторых белков семейства HSP70 может усиливаться в ответ на УФ-излучение, воздействие тяжелых металлов и т.д., с другой стороны, обнаружены белки, присутствующие в клетках постоянно, независимо от воздействия стрессовых факторов.

На примере белков HSP70, характеристика которых приведена в табл. 8.1, видно, что собственная шаперонная система имеется практически в каждом клеточном компартменте. Для того чтобы лучше понять принцип работы шаперонных систем, рассмотрим строение белков, входящих в их состав.

Первой в фолдинге белка принимает участие система HSP70 и ко-шаперона HSP40. HSP70 состоит из двух доменов: N-концевого нуклеотид-связывающего домена [1, 2] с молекулярной массой 44 кДа и С-концевого субстрат-связывающего домена, существенно различающегося по молекулярной массе и структуре у разных представителей семейства HSP70 [3, 4]. Два домена соединены высококонсервативным линкером (5 аминокислотных остатков). Нуклеотид-связывающий, или АТФ-азный, домен способен специфически взаимодействовать с нуклеотидами (преимущественно АДФ-ADP и АТФ-ATP), катализировать гидролиз АТФ, а также взаимодействовать с молекулами ко-шаперонов (HSP40).

Таблица 8.1 – Характеристика некоторых белков теплового шока семейства HSP70

Обозначение в NCBI	Обозначение гена	Название белка (синонимы)	Клеточная локализация	Характер экспрессии
NM_005346	<i>HSPA1B</i>	heat shock 70kDa protein 1B (HSP70-2, HSP70A1B)	Цитоплазма, ядро	Индукцибельный
NM_005527	<i>HSPA1L</i>	heat shock 70kDa protein 1-like (HSP70-HOM, hum70t)	Цитоплазма, ядро	Конститутивный
NM_021979	<i>HSPA2</i>	heat shock 70kDa protein 2	Митохондрии, клеточная поверхность	Конститутивный
NM_006597	<i>HSPA8</i>	heat shock 70kDa protein 8 (HSPA10, HSC71, HSC70, HSP73)	Цитоплазма, ядро, клеточная поверхность	Конститутивный
NM_004134	<i>HSPA9B</i>	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin, HSPA9B, GRP75, PBP74, mot-2, mtHSP75)	Митохондрии, цитоплазма, ЭПР, клеточная поверхность,	Конститутивный
NM_005347	<i>HSPA5</i>	heat shock 70kDa protein 5, glucose-regulated protein, 78kDa (GRP78, BiP, MIF2)	ЭПР	Индукцибельный
NM_016299	<i>HSPA14</i>	heat shock 70kDa protein 14 (HSP70-4, HSP70L1)	Цитоплазма, связан с рибосомами	Не определено

Субстрат-связывающий домен состоит из субстрат-связывающего участка и 10 кДа С-концевого субдомена с аминокислотной концевой последовательностью EEVD. Этой последовательности соответствуют последние 4 кодона мРНК, обеспечивающие ее приоритетную трансляцию при тепловом шоке [5]. Молекулярная структура типичного представителя описываемого семейства – конститутивного HSC70 [6] – показана на рис. 8.1.

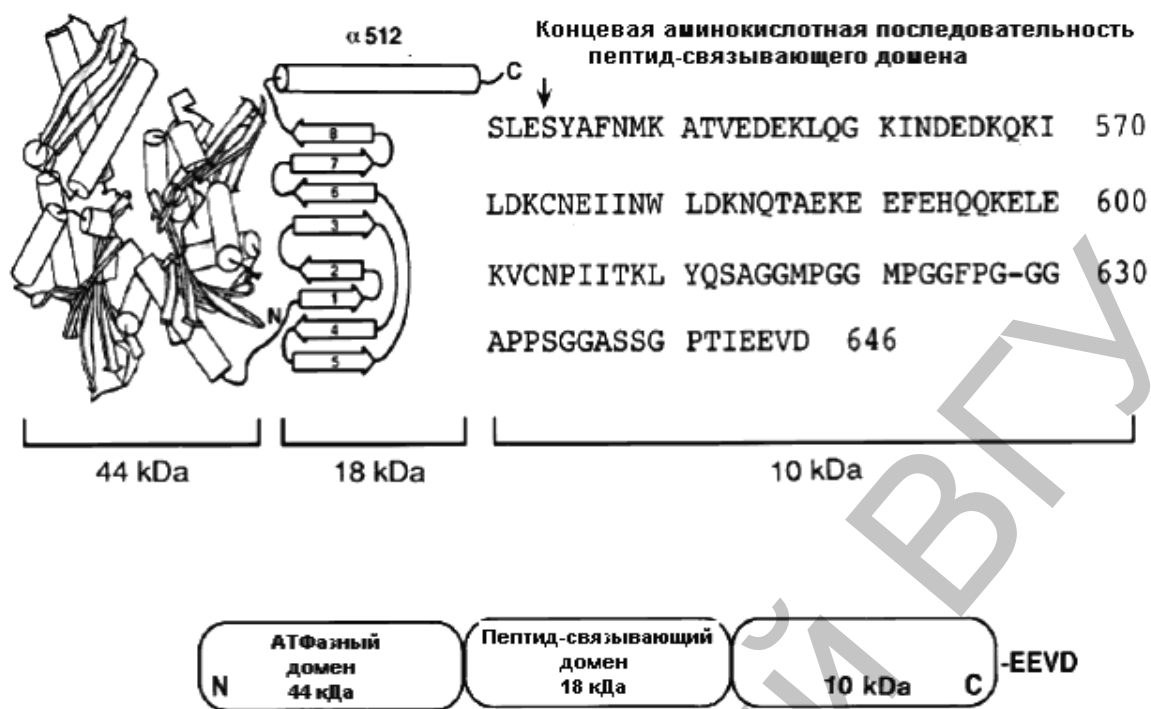


Рис. 8.1. Схема строения конститутивного белка теплового шока HSP70.

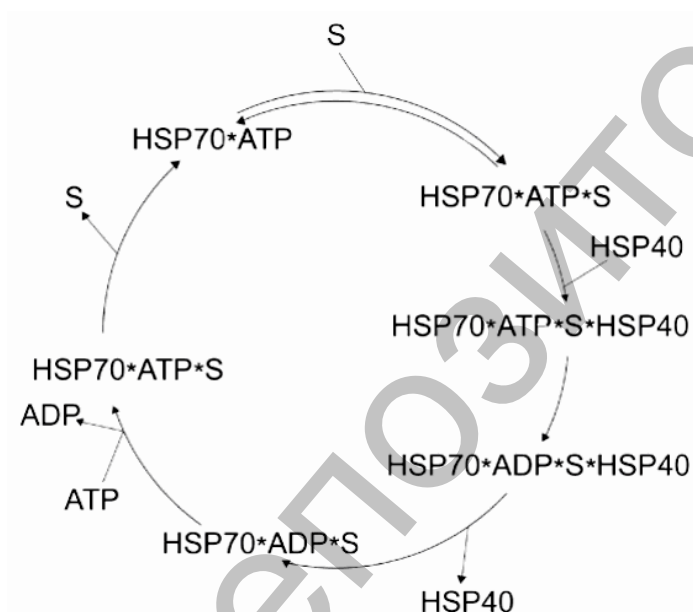


Рис. 8.2. Схема шаперонного цикла HSP70.
Р – пептидный субстрат.

Предложена следующая модель, описывающая работу этой шаперонной системы [7–9] (рис. 8.2).

HSP70 существует внутри клетки в виде бинарного комплекса с нуклеотидом АТФ. В таком виде он активно взаимодействует с пептидными фрагментами, но образующиеся комплексы не являются достаточно прочными. Для того чтобы образовавшийся комплекс стабилизировался, необходима замена АТФ на АДФ в активном центре субстрат-связывающего домена, ко-

торая может быть осуществлена либо за счет поступления АДФ из цитоплазмы, либо за счет АТФ-азной активности самого HSP70. Присутствие кошаперона HSP40 также стимулирует гидролиз АТФ в связанном с HSP70 состоянии, приводя к образованию комплекса HSP70-АДФ-субстрат. Не ис-

ключается также, что HSP40 может выступать в качестве иницирующего шаперона. Освобождение белка-субстрата из комплекса HSP70-АДФ-субстрат происходит при связывании с АТР, которое индуцирует конформационные изменения в субстрат-связывающем домене. Видно, что на конформацию шаперона и его аффинность к субстрату существенно влияет природа связанного нуклеотида. Если в реакционную смесь вместо АДФ добавлять другие адениловые нуклеотиды АМФ, сАМФ или другие, то образование комплексов с пептидами существенно ингибируется.

Именно концентрация ADP в среде является важным параметром комплексообразования. Установлено, что в норме концентрация АТФ в клетке составляет около 2мМ, а АДФ – около 0,5мМ. Чтобы изучить влияние концентрации ADP на динамику связывания HSP70 *in vitro*, использовались меченые флуоресцентной меткой FITC пептиды, которые смешивали с HSP70_{A1B} и HSC70 в соотношении 5:1. После определенного периода совместной инкубации свободный пептид отделяли с помощью ультрафильтрации, а количество связавшегося с белком пептида измеряли по оптическому поглощению метки.

Ниже приведены примеры полученных графиков, показывающие, что повышение концентрации АДФ приводит к увеличению сродства индуцибельного HSP70_{A1B} и конститутивного HSC70 к пептидному субстрату, причем у конститутивного белка сродство повышается более плавно (рис. 8.3).

Проведенные кинетические эксперименты позволяют рассчитать константы скоростей образования комплексов и равновесные константы диссоциации комплексов HSP70_{A1B} и HSC70 с мечеными FITC пептидами. Расчеты констант проводят на основе эмпирически определенных коэффициентов [10] экспоненциальных уравнений, описывающих зависимость насыщения рекомбинантных белков пептидами от времени инкубации следующим образом:

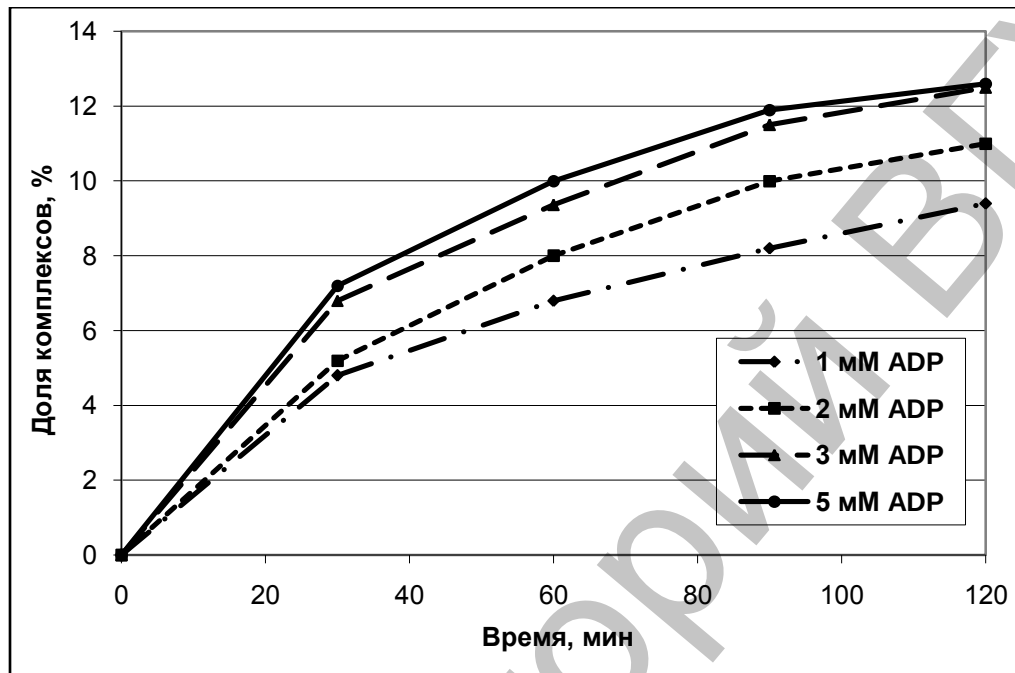
$$y = A(1 - e^{-kt}) ,$$

где y – концентрация комплексов, нМ; A – предэкспоненциальный множитель, определяющий максимальную асимптоту; k – показатель экспоненты.

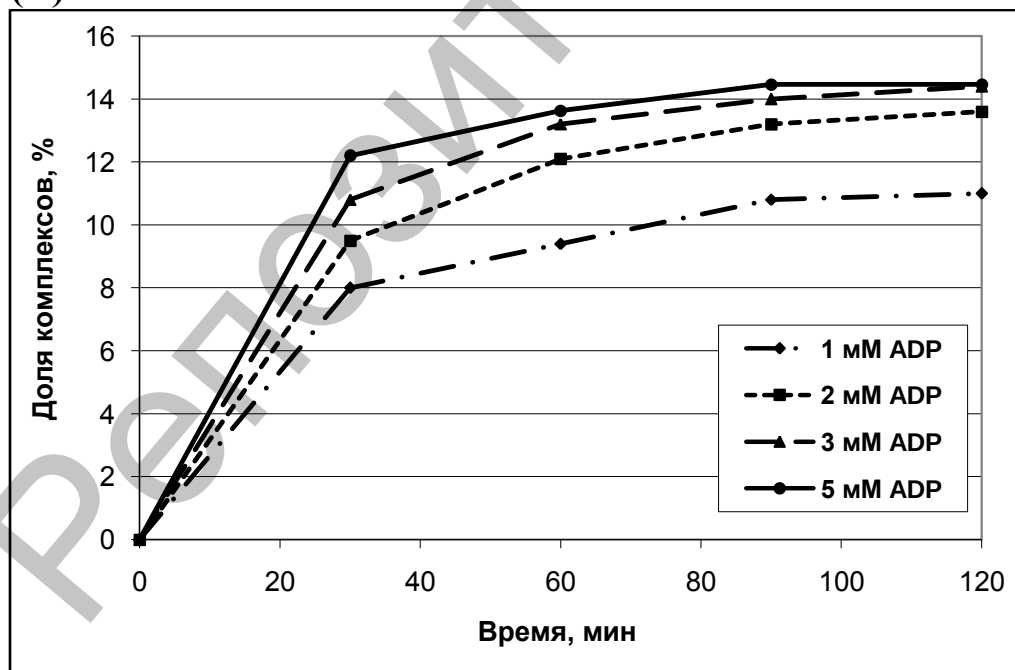
Для эмпирического определения данных показателей исходные данные в виде матрицы { % комплексов; t инкубации } конвертируют в матрицу вида { $C_{\text{комплексов}}$; t инкубации }, после чего программными средствами (например, с помощью ПО OriginPro 8.0) определяют параметры уравнения регрессии вида $y = A(1 - b^{-kx})$. Эмпирические значения коэффициентов ин-

терпретируют следующим образом: $A = \frac{HSP_0 \cdot pep_0}{pep_0 + Kd}$, где HSP_0 и pep_0 – исходные концентрации соответствующего белка и свободного пептида, а Kd – равновесная константа диссоциации комплексов;

$k = k_{обр} \cdot pep_0 + k_{дисс}$, где $k_{обр}$ и $k_{дисс}$ – константы скоростей образования и диссоциации комплексов соответственно.



(А)

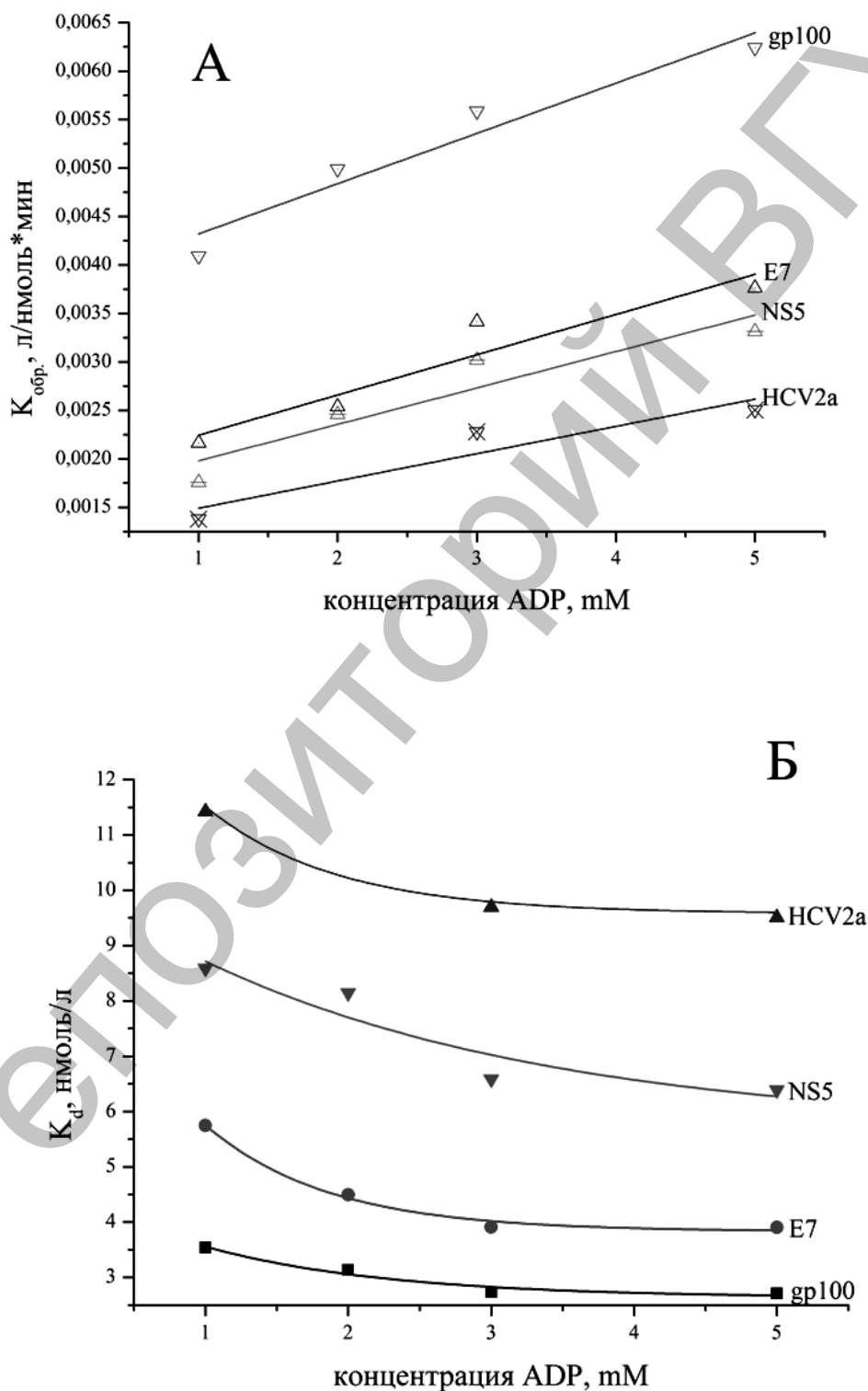


(Б)

Рис. 8.3. Зависимость средства индуцибельного HSP70_{A1B} (А) и конститутивного HSC70 (Б) к пептидному субстрату от концентрации АДФ.

Значения K_d , $k_{обр}$ и $k_{дисс}$ определяют путем решения соответствующих уравнений методом подстановки с использованием эмпирически определенных величин A и k .

Итак, видно, что повышение концентрации АДФ в среде увеличивает константу скорости образования комплексов (рис. 8.4).



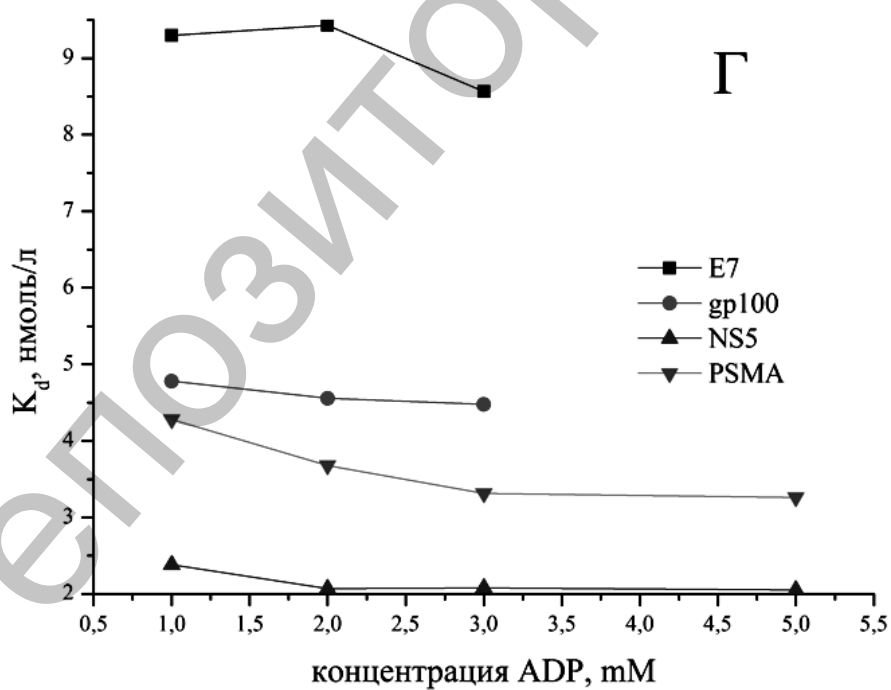
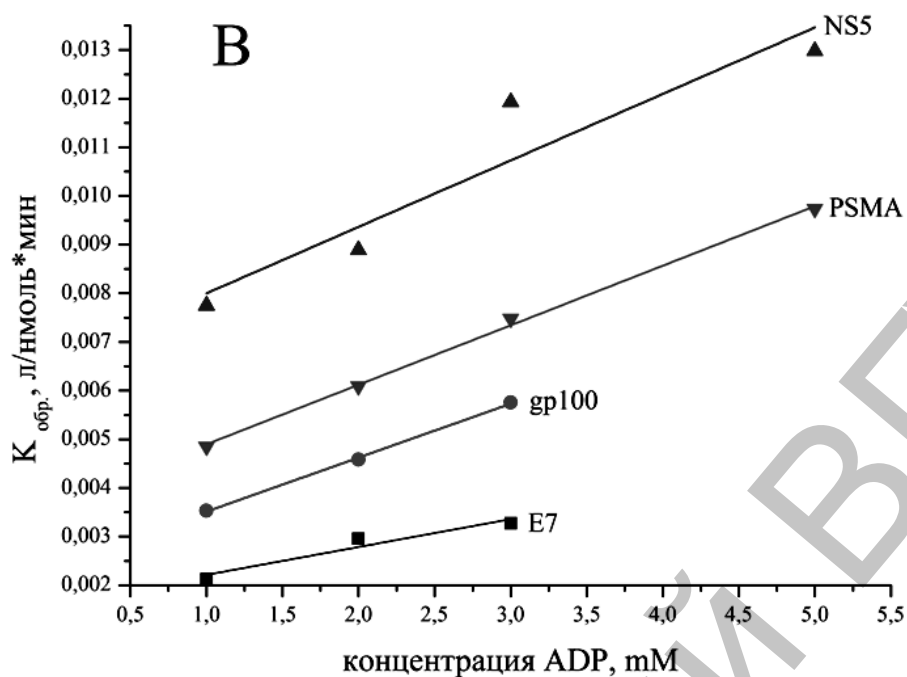


Рис. 8.4. Зависимость констант скоростей образования комплексов с разными пептидами белков HSC70 (А) и HSP70_{A1B} (В) и равновесных констант диссоциации комплексов белков HSC70 (Б) и HSP70_{A1B} (Г) от концентрации АДФ.

Константа диссоциации комплексов с исследованными пептидами при повышении концентрации АДФ. Сопоставляя полученные данные о динамике образования комплексов, можно сделать вывод о том, что не только АТФ, но и АДФ как нуклеотидный фактор способствует ускорению взаимодействий белков семейства HSP70 с пептидами, индуцируя конформационные изменения в АТФ-азном домене, что, по-видимому, приводит к облегчению взаимодействия пептида с HSP70. Молекулы АДФ выполняют двойную функцию: индуцируют конформационные изменения, облегчающие взаимодействие с пептидами, и стабилизируют «закрытую» конформацию субстрат-связывающего домена, обеспечивающую высокую стойкость пептидных комплексов. Почему же именно АДФ служит своего рода сигналом для запуска шаперонного цикла?

Наиболее вероятный ответ на этот вопрос можно найти, вспомнив, что АДФ может подвергаться в клетке ферментативному диспропорционированию: $2\text{АДФ} = \text{АТФ} + \text{АМФ}$. Возникновение гипоенергетического состояния, таким образом, сопровождается повышением концентрации в клетке именно АМФ. Но если нарушается работа ферментов (являющихся полипептидами по своей химической природе и требующих рефолдинга), то накапливается в клетке АДФ.

Важными факторами, влияющими на скорость протекания практически любой реакции в растворе, являются значения температуры и pH среды.

Лабораторная работа № 1

Изучение влияния температуры и pH на эффективность образования комплексов рекомбинантных белков HSP70 с пептидами, мечеными флуоресцентной меткой FITC

Приборы: Градиентный ВЭЖХ хроматограф, колонка C18 или другая с обращенной фазой, центрифуга, ультрафильтрационные ячейки с мембраной, пропускающей частицы размером не более 10 кДа (например Amicon Ultra-4 10K), пипет-дозаторы от 1 до 1000 мкл, микропробирки типа erpendorf.

Реактивы: белок теплового шока HSP70, пептид (лучше выбирать короткий, около 9 аминокислотных остатков, не содержащий Лиз), ADP, ATP, NaCl, Трис-HCl, MgCl_2 , ацетонитрил, дистиллированная вода, трифторуксусная кислота.

Ход работы:

Получение меченых FITC синтетических пептидов

2 мг пептида растворяют в 400 мкл 0,1M NaHCO_3 pH 8,8 и добавляют раствор FITC в DMSO (10 мг/мл) в молярном соотношении 1:1. Смесь ин-

кубируют при перемешивании при комнатной температуре в течение 3–4-х часов. Меченый пептид отделяют методом ВЭЖХ на колонке C₁₈. Элюируют градиентом от 0 до 100% ацетонитрила в 0,1% TFA. Детекцию проводят при длине волны 495 нм.

Получение комплексов индивидуальных пептидов с HSP70

Комплексы пептидов с белками HSP70 получают путем совместной инкубации 5-кратного избытка меченого FITC пептида с 40 мкг белка HSP70 в буферных растворах Buf pH 8,0 (100 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂) и Buf pH 6,0 (100 мМ Трис-HCl, pH 6,0, 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂) в присутствии 5 мМ АДФ. Инкубируют смесь в течение 30, 60, 90, 120 минут при температуре 4, 15, 25 и 37 °С. После этого смесь разбавляют соответствующим буфером в 5 раз и центрифугируют в фильтровальной ячейке до конечного объема не более 50 мкл. Очистку повторяют 2 раза. Количество связавшегося меченого FITC пептида определяют по оптической плотности при длине волны 495 нм.

Определение кинетических характеристик реакции

Кинетические характеристики связывания HSP70 с пептидами определяют, как описано выше, по эмпирически построенной кривой вида $y = A(1 - b^{-kx})$.

Ожидаемые результаты.

Максимальное количество комплексов образуется при температуре 25 °С, поскольку именно переход из «открытой» R-конформации в «закрытую» T-конформацию, стабилизирующую комплекс с пептидом, происходит именно при данном значении температуры [11].

Влияние pH среды на связывание HSP70 с пептидами зависит от свойств последних. Известно, что HSP лучше взаимодействует с гидрофобными пептидами.

Гидролиз АТФ является основной функцией N-концевого домена. Описанные механизмы аутофосфорилирования HSP70 (т.е. обратимого переноса фосфатной группы с АТФ на HSP70 с образованием АДФ в нуклеотид-связывающем центре) проявляются лишь в специфических условиях, в частности, индуцируются повышением концентрации ионов Ca²⁺. Вспомните, какие гормоны приводят к повышению концентрации Ca²⁺ в клетке и попробуйте определить биологический смысл процесса аутофосфорилирования.

Рекомбинантные HSP70, выделенные из биомассы бактерий, имеют более низкую АТФ-азную активность (от 0,7 до 2,8 нмоль/мг·мин), чем препараты, выделенные из тканей с помощью аффинной хроматографии на сорбенте АДФ-сефароза (15–20 нмоль/мг·мин). Логично было бы предположить,

что величина АТФ-азной активности характеризует работоспособность белка, правильность его укладки, а, следовательно, является важнейшей характеристикой качества получаемого рекомбинантного продукта.

Однако если при проведении очистки рекомбинантных HSP70 добавлять в буферные растворы АТФ до концентрации 0,5 мМ, то АТФ-азную активность полученный белок проявлять не будет, а пептидные комплексы с таким белком будут образовываться намного легче. Если измерять АТФ-азную активность препаратов, содержащих разное количество пептидных комплексов, то окажется, что АТФ-азная активность пропорциональна количеству образовавшихся комплексов и угол наклона получаемой прямой различается для индуцибельного HSP70_{A1B} и конститутивного HSC70 (рис. 8.5).

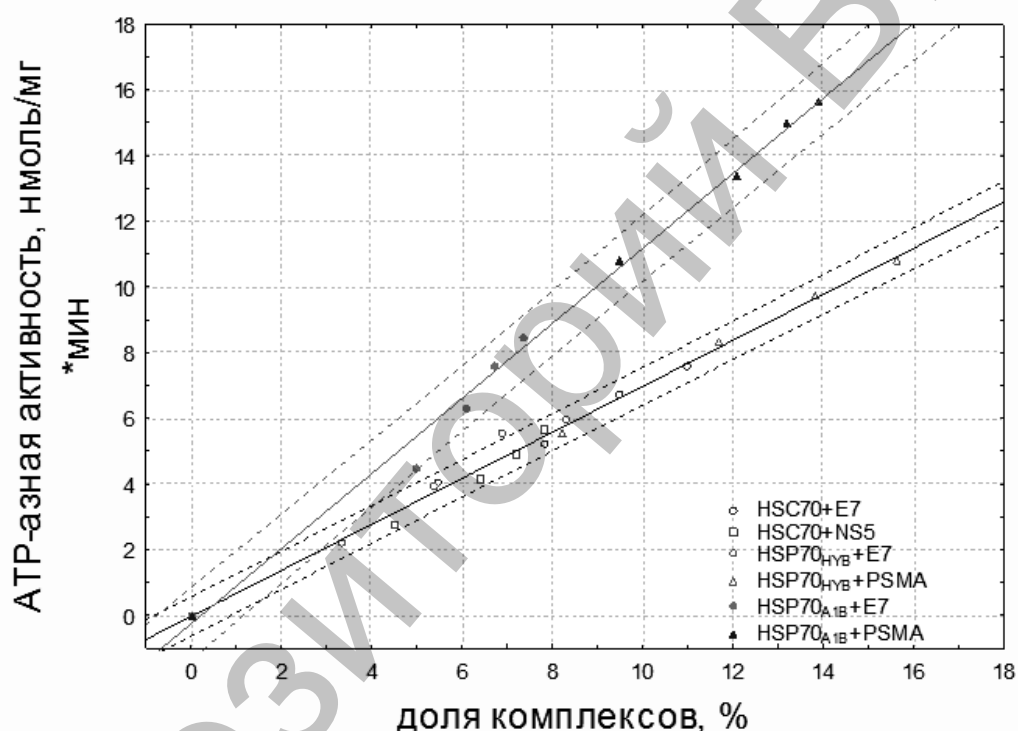


Рис. 8.5. Зависимость АТФ-азной активности белков HSC70, HSP70_{HYB} и HSP70_{A1B} от доли комплексов с мечеными пептидами E7, NS5 или PSMA в препарате белка.

Прерывистыми линиями показан 95% доверительный интервал.

Таким образом, можно утверждать, что изменение конформации HSP70 может быть инициировано не только связыванием лиганда с N-концевым АТФ-азным доменом, но и спонтанным захватом пептида в С-концевом домене. На рис. 8.5 хорошо видно, что величина АТФ-азной активности не зависит от природы пептида, но определяется лишь количеством образовавшихся комплексов. Угловым коэффициентом полученной прямой можно, таким образом, считать количественной оценкой способности С-концевого домена HSP70 возбуждать конформационные изменения

всего белка и запускать продуктивный шаперонный процесс. Для простоты дальнейшего изложения назовем эту величину «коэффициентом сопряжения доменов».

Найденная зависимость также может быть использована для количественной оценки связанных с HSP70 немеченых пептидов. Предлагаемый способ является единственным на данный момент и имеет определенные ограничения, поскольку не учитывает влияния ко-шаперонов. Вероятнее всего многие из внутриклеточных шаперонов, если не все, обладают разным коэффициентом сопряжения доменов и это не дает возможности определять количество комплексов в их смеси.

Для того чтобы подтвердить эту гипотезу, в НИИ Молекулярной Медицины ММА им. И.М. Сеченова был получен гибридный белок HSP70_{HYB}, содержащий N-концевой домен HSP70_{A1B} и C-концевой домен HSC70. Вопреки ожиданиям изменение величины АТФ-азной активности у полученного гибрида происходило так же, как у HSC70, несмотря на различающиеся АТФ-азные домены. Интересно, что предпочтения в связывании пептидов у гибридного белка были такие же, как у HSP70_{A1B}.

Лабораторная работа № 2

Приборы: центрифуга, ультрафильтрационные ячейки с мембраной, пропускающей частицы размером не более 10кДа (например Amicon Ultra-4 10K), пипет-дозаторы от 1 до 1000 мкл, микропробирки тип eppendorf.

Реактивы: белок теплового шока HSP70, пептиды известного состава (лучше выбрать не слишком длинные, до 20 аминокислот), АДФ, АТФ, NaCl, Трис-HCl, MgCl₂, глицерин, дистиллированная вода, краситель малахитовый зеленый, молибдат аммония.

Ход работы:

Получение комплексов индивидуальных пептидов с HSP70

Комплексы пептидов с белками HSP70 получают путем совместной инкубации известного избытка пептида с 20 мкг белка HSP70 в буферных растворах Buf pH 8,0 (100 mM Трис-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂). Инкубируют смесь в течение 30, 60, 90, 120 минут при комнатной температуре.

Определение кинетических характеристик реакции

Гидролиз АТФ тестируют колориметрическим методом по накоплению в реакции неорганического фосфата. Реагент для определения неорганического фосфата: 2 мл 0,08% водного раствора малахитового зеленого, 2 мл 2,3% водного раствора поливинилового спирта, 1 мл 5,7% раствора (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O в 6N HCl и 2 мл H₂O. Реакцию проводят в реакционной

смеси состава: 50 мМ Трис-НCl, pH 8,0, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 5% глицерин, 0,2 мМ АТФ. Для определения скорости гидролиза к 100 мкл реакционной смеси с исследуемым белком инкубируют при 30 °С в течение 30 мин и 1 часа, добавляют 400 мкл окрашенного реагента и определяют оптическое поглощение при длине волны 630 нм. В контрольном опыте аликвоту белка заменяют эквивалентным объемом 50 мМ Трис-НCl, pH 8,0. АТФ-азную активность измеряли в нмоль/мг·мин по калибровочной прямой, построенной по фосфату натрия.

ВНИМАНИЕ! Способ очень чувствительный и позволяет определять ионы фосфата в концентрациях от 1мкМ. Следует выбрать диапазон для калибровочной прямой от 0,5мкМ до 20–40 мкМ. При выполнении работы следует быть очень аккуратным, чтобы избежать попадания фосфатов в растворы.

Ожидаемые результаты:

В условиях эксперимента белок теплового шока проявляет АТФ-азную активность. Чем длительнее время предварительной инкубации с пептидом – тем выше АТФ-азная активность. Объяснение этому дано в тексте главы. Попробуйте предсказать, в каком случае будет выше значение АТФ-азной активности – если инкубировать белок с АТФ 30 мин или 60 и почему? Если вы использовали пептиды из Лабораторной работы № 1, сопоставьте максимальное количество образовавшихся комплексов с максимальной величиной АТР-азной активности.

Обнаружение зависимости АТФ-азной активности от доли комплексов в препарате HSP70 сделало возможным проведение экспериментов со смесью меченого и немеченого пептидов, обладающих разной аффинностью к исследуемым белкам. Такая смесь позволяет смоделировать взаимодействие HSP70 со смесью неизвестных пептидов. Для экспериментов были подготовлены 3 смеси, содержащие один из меченых FITC пептидов, – NS5, E7 или gp100 и немеченый пептид PSMA в молярном соотношении 1:1. Белок HSP70_{НУВ} инкубировали с 5-, 10- и 20-кратным молярным избытком каждой из данных смесей в течение 2-х часов. В результате было показано, что высоко аффинные пептиды обладают способностью вытеснять низко аффинные из состава комплексов с HSP70_{НУВ} при повышении общего соотношения пептид–HSP70 (рис. 8.6).

Считается, что эффект шаперонной системы HSP70 связан либо с временным экранированием гидрофобных участков фолдируемой молекулы, либо с имитацией образования полипептидной цепи на рибосоме.

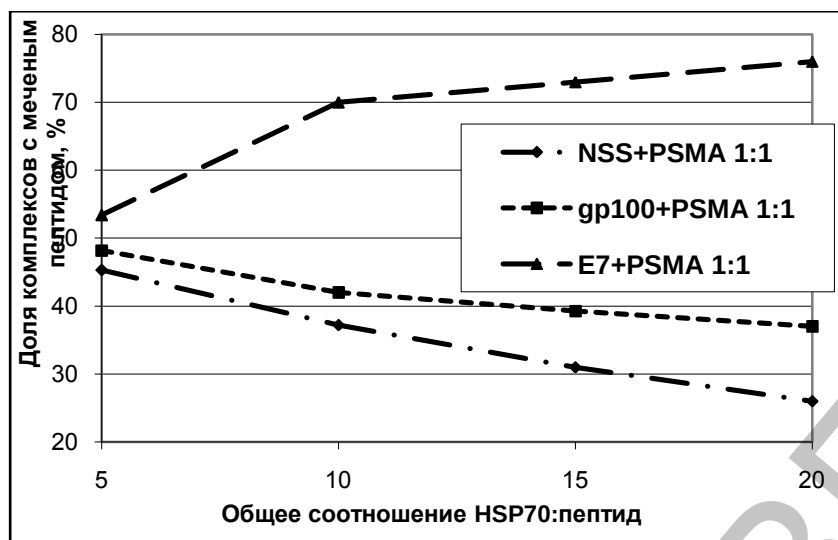


Рис. 8.6. Способность аффинных пептидов вытеснять низко аффинные из состава комплексов с HSP70_{НУВ} при повышении общего соотношения пептид–HSP70. Аффинность пептидов убывает в ряду NS5 > PSMA > gp100 > E7.

Шаперонная система HSP60 может быть задействована в случае неудачного фолдинга с участием HSP70. HSP60 составляют структуру из 14 протомеров (2 кольца по 7 протомеров) наподобие бочонка, внутрь которого помещается несвернутый белок. Изолированный от внешних воздействий, он должен приобретать правильную конформацию.

2. Дегградация белков

Если шаперонным системам не удалось вернуть белку его нативную конформацию, то протеиновая молекула подлежит дегградации. В клетках эукариот существует 2 системы, отвечающие за разрушение белков, – это лизосомы и протеасомы. Сигналом для транслокации к лизосомам служит последовательность KFERQ в составе полипептидной цепи. Протеасомы распознают аминокислотные последовательности, присоединенные к белку – убиквитину, который присоединяется убиквитин-лигазами. Именно этим ферментам принадлежит решающая роль в распознавании полипептидных цепей, подлежащих элиминации. Убиквитин присоединяется к остаткам лизина, а затем происходит удлинение убиквитиновой «цепочки». Полиубиквитиновые белки транспортируются при помощи шаперонов в протеасому.

Процесс внутриклеточной дегградации белков обеспечивает выполнение двух главных задач: во-первых, своевременное разрушение белков обеспечивает изменение скорости тех или иных метаболических путей, предотвращает развитие «протеинового шока» и пополняет запас аминокислот внутри клетки; во-вторых, протеасомальная дегградация белков стимулирует сборку молекул главного комплекса гистосовместимости I типа (МНС-I) и представление внутриклеточных антигенов Т-лимфоцитам.

Интересно, что работа протеасом также контролируется иммунной системой. Показано, что воздействие γ -интерферона на клетки приводит к замене трех конститутивных субъединиц ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$) на индуцибельные мультикаталитические протеиназы (LMP2, LMP10 и LMP7 соответственно), в результате чего метод «нарезания» деградируемого белка изменяется таким именно образом, чтобы количество МНС-рестриктированных эпитопов увеличивалось. Такие протеасомы получили название «иммунопротеасом». Показано, что иммунопротеасомы обладают специфичностью, сходной с трипсином и химотрипсином [12].

Таким образом, роль шаперонов в развитии инфекционного процесса представляется двоякой. С одной стороны, внутриклеточные «паразиты», каковыми являются, например, вирусы, активно используют шаперонные системы для сборки собственных белковых частиц, с другой – именно белки теплового шока переносят чужеродные белковые частицы к протеасомам и обеспечивают реализацию Т-клеточного иммунного ответа в отношении инфицированных клеток.

Сходная картина наблюдается и в клетках злокачественных новообразований. Накопление мутаций, определяющих перерождение нормальной клетки в опухолевую, неизбежно приводит к экспрессии в клетках аномальных белков. Это белки, свойственные эмбриональным или фетальным тканям, или белки с аномальной первичной структурой. Так или иначе, накопление этих белков приводит к повышению нагрузки на шаперонные системы и, следовательно, на протеасомы. Как следствие – антигенная мозаика, представленная на поверхности опухолевых клеток в составе МНС-I, отличается от нормальных клеток. Почему же в таком случае иммунная система не элиминирует опухоль? Почему происходит обратное – опухоль ингибирует иммунный ответ?

3. Основы иммунологии опухолей

За иммунологический контроль над опухолевым ростом отвечают естественные киллеры (ЕК, они же Нормальные Киллеры – НК). Доказывается это утверждение тем, что у линейных мышей с иммунодефицитами, связанными с дисфункцией других систем, частота развития опухолей практически не изменяется по сравнению с «дикими» мышами. Нарушение работы НК-клеток приводит к резкому повышению частоты развития опухолей, поскольку считалось, что опухолевая клетка перестает экспрессировать МНС-I, отсутствие которого на поверхности клетки является сигналом для активации НК-клеток. Позже, однако, было показано, что на поверхности

многих опухолевых линий присутствуют комплексы МНС-I [13]. Каким же образом опухоли все-таки удается ускользать от иммунного контроля?

Ответ на этот вопрос до конца не определен и в настоящее время. Если возникновение опухолевой клетки – это процесс спонтанный, случайный, связанный с мутацией, то в развитии опухоли ключевая роль принадлежит иммунному отбору, механизм которого сходен с естественным дарвиновским отбором. Выделяют 3 этапа взаимодействия опухоли с иммунной системой. На первом – возникающие опухолевые клетки успешно элиминируются. На втором – появляется опухолевая клетка, которая не вызывает достаточно сильной иммунной реакции, обладает устойчивостью к апоптозу – возникает равновесие. Третий этап – это сдвиг равновесия в сторону усиления опухолевого роста. На последнем этапе развивается иммунная толерантность за счет ингибирующего влияния «зрелой» опухоли.

Выделяют три основных механизма возникновения резистентности у опухолевых клеток. Во-первых, это – нарушение путей апоптоза (мутации каспаз, белка p53, активация ингибиторов апоптоза, в т.ч. увеличение количества внутриклеточных шаперонов). Во-вторых, это нарушение структуры рецепторов, взаимодействующих с клетками иммунной системы и представление Т-лимфоцитам антигенов, обладающих слабой иммуногенностью. Третий защитный механизм связан с продукцией ингибирующих цитокинов.

Специфический клеточный ответ, который представляют Т-киллеры ($\alpha\beta$ CD8+Т-лимфоциты), является одной из наиболее мощных подсистем иммунитета. Созревание CD8+Т-лимфоцитов происходит в тимусе, где отбираются только те клоны Т-лимфоцитов, которые не реагируют на собственные антигены. Однако и после выхода из тимуса «наивные» Т-киллеры не способны проявлять цитотоксическую активность в отношении клетки, несущей на своей поверхности чужеродный антиген в составе комплекса МНС-I типа. Т-лимфоцит должен быть предварительно активирован специализированной антиген-презентирующей клеткой (АПК) и/или Т-хелпером (CD4+Т-лимфоцитом) [14].

Именно на АПК по сути возложена задача селекции чужеродных антигенов. Все антигены, образующиеся в АПК, представляются Т-киллерам в составе МНС-I типа и сопровождаются неспецифическим стимулирующим сигналом. «Свои» антигены не вызывают иммунного ответа благодаря предварительной селекции в тимусе. Сочетание специфического сигнала чужеродного антигена и неспецифического стимулирующего сигнала приводит к появлению у Т-лимфоцитов цитотоксической активности.

В случае, если вирус поражает АПК, вопросов больше не возникает. Сборка вирусных частиц опосредуется шаперонами, активируются протеа-

сомы, и вирусные антигены попадают в МНС-I типа. А как быть с вирусами, которые в АПК не попали?

Известно, что часто активное размножение вируса в клетках приводит к их разрушению (некрозу) и попаданию собранных вирусных частиц и содержимого клетки в межклеточную жидкость и другие внутренние среды организма. На поверхности АПК имеется множество разнообразных рецепторов, способных захватывать весь этот белковый «мусор» и включать его в путь презентации антигенов. Большая группа таких рецепторов получила название scavenger-рецепторы, т.е. «мусорщики». Считалось общепризнанным, что экзогенные антигены процессируются макрофагами и дендритными клетками и представляются в составе МНС-II типа, который взаимодействует с CD4+Т-лимфоцитами (а не CD8+Т-лимфоцитам). В 90-х годах прошлого века был открыт феномен кросс-презентации антигенов, т.е. представление захваченных АПК антигенов в составе МНС-I типа. Именно этот процесс является ключевым в формировании специфического клеточного иммунного ответа (рис. 8.7).

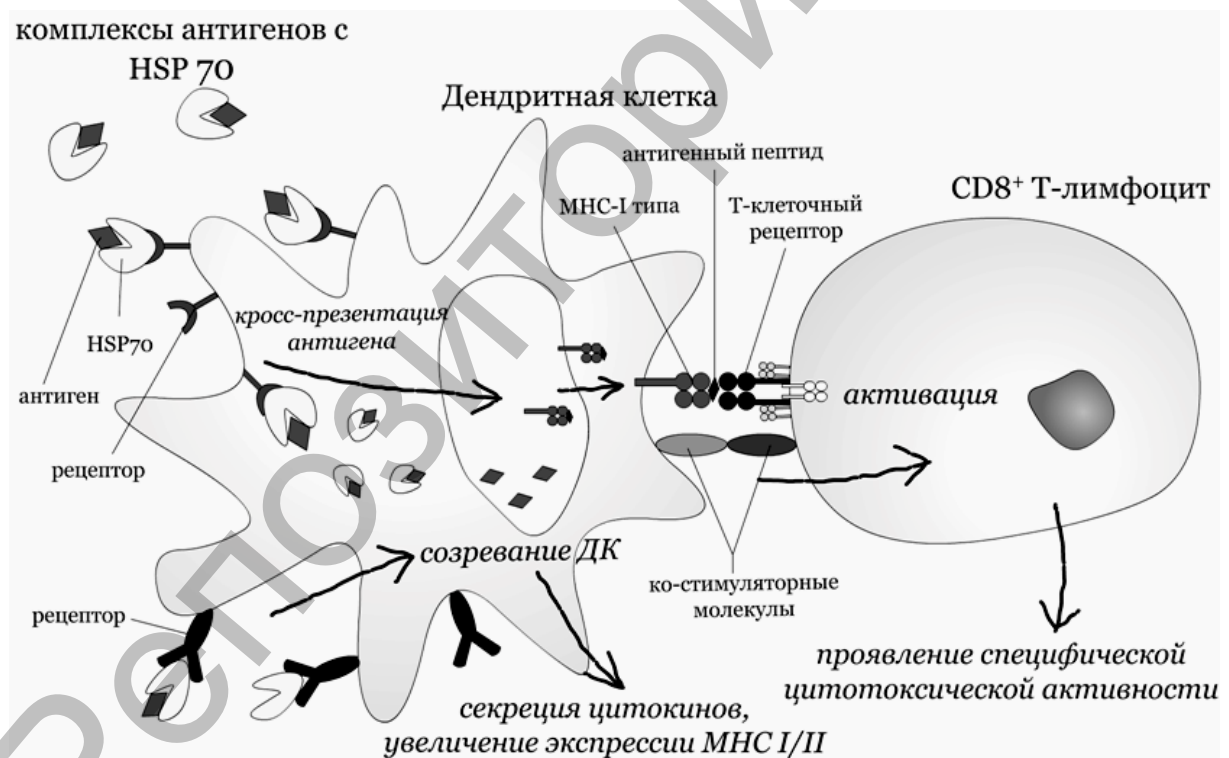


Рис. 8.7. Формировании специфического клеточного иммунного ответа.

В отличие от клеток, пораженных вирусом, опухолевые клетки практически никогда не разрушаются «по собственной воле». А это значит, что и антигены злокачественных клеток не попадают во внутренние среды организма, не подвергаются кросс-презентации и не приводят к развитию

специфического Т-клеточного иммунитета. Итак, видно, что важную роль в ускользании раковых клеток от иммунной системы играет отсутствие кросс-презентации опухолевых антигенов и, как мы увидим далее, значительную роль в кросс-презентации играют белки теплового шока.

4. Внеклеточная роль шаперонов

Появление белков HSP70 во внутренних средах организма, как правило, коррелирует с увеличением их количества внутри клеток той или иной ткани или органа и обусловлено стрессовыми воздействиями самого разного рода - от гипертермии, гипоксии и ацидоза [15] до повышения концентрации катехоламинов [16], АКТГ или стероидных гормонов.

Предполагают 2 механизма выхода HSP70 из клетки:

- активный выброс;
- выход HSP70 в результате гибели клетки.

Механизм активного выброса HSP70 из клеток, по-видимому, отличается от классического пути [17], включающего последовательный транспорт вновь синтезированного белка из ЭПР в аппарат Гольджи и затем в составе везикул через плазматическую мембрану, поскольку не ингибируется монензином и колхицином [18]. Альтернативные пути активного выброса HSP70 связывают с липидными рафтами (детергент-устойчивыми мембранными доменами) [19] и экзосомами [20]. Показано, что около 70% секретируемого В-лимфоцитами и до 30% – Т-лимфоцитами HSP70 связано с липидными рафтами.

Существенный вклад в секрецию HSP70 вносят, по-видимому, и экзосомы, связанные с мембраной везикулы размером 60–100 нм. Известно, что в экзосомах содержатся различные иммуностимуляторные молекулы и молекулы адгезии [20]. Сигналы для секреции экзосом и HSP70 схожи. Показано, что после 3-х часового нагревания выброс HSP70 В-лимфоцитами увеличивается в основном за счет увеличения числа экзосом. Известно, однако, что повышение выброса HSP70 мононуклеарами периферической крови при тепловом шоке происходит за счет увеличения его содержания в экзосомах.

Приведенные выше данные убедительно показывают, что вне клеток HSP70 играет важную роль как сигнальная молекула, вероятнее всего стимулирующая усиление иммунологического контроля. Дополнительным тому подтверждением является пассивный выброс HSP70 только после некротической, но не апоптотической гибели клеток.

Предполагают, что на поверхности АПК есть минимум 2 типа рецепторов, с которыми связывается и посредством которых интернализуется

HSP70 [21]. Причем связывание с разными рецепторами осуществляется соответственно через субстрат-связывающий и АТФ-азный домены и, по-видимому, приводит к включению HSP70 в разные внутриклеточные процессы. На роль рецепторов, опосредующих эндоцитоз HSP70, претендуют в настоящее время CD91 и CD40. Первый из них считают универсальным рецептором для широкого спектра молекул.

Существует еще одна группа рецепторов, которая предположительно отвечает за связывание и интернализацию HSP70, – это уже упоминавшиеся scavenger-рецепторы. Известно, по крайней мере, 3 рецептора данной группы, с которыми предположительно взаимодействует HSP70, – это LOX-1, SREC-1 и FEEL-1/CLEVER-1 [22–24]. Поиск рецепторов к HSP70 на различных иммунокомпетентных клетках продолжается.

Внеклеточные шапероны несут с собой захваченные в стрессовых условиях пептидные фрагменты. Захваченные с помощью рецептора, комплексы белков теплового шока с пептидами отделяются от рецептора в цитоплазме, после чего приобретают способность вступать в те же метаболические процессы, что и в других клетках. Таким образом, захваченные HSP пептидные фрагменты подвергаются протеасомальному расщеплению в АПК и представляются Т-лимфоцитам. Помимо усиления кросс-презентации антигенов, которая приводит в конечном итоге к появлению специфических цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, было показано, что HSP70 индуцирует Th1 поляризацию CD4⁺ Т-лимфоцитов, способствующую преодолению опухолевой иммунорезистентности [24]. Кроме того, в настоящее время известно, что HSP70 является активатором нормальных киллеров. Определен рецептор CD94 на поверхности НК для связывания HSP70, а также эпитоп в С-концевом домене, связывающийся с данным рецептором [25].

Вопрос о способности HSP70 активировать врожденные иммунные механизмы: индуцировать продукцию цитокинов, вызывать созревание ДК и т.д. – до сих пор открыт. Разными группами исследователей показано как наличие указанных эффектов, так и отсутствие таковых у высокоочищенного белка [26–27]. Можно предположить как недостаточную степень очистки белка в исследованиях, подтверждающих активацию врожденного иммунитета, так и потерю нативной конформации с последующей утратой эффекта HSP70, использованного в экспериментах, результаты которых опровергают такую активацию. Существует точка зрения, что стимуляция продукции цитокинов ДК *in vivo* носит непрямой характер и опосредуется НК-клетками.

Так или иначе, но в нашем распоряжении оказывается белок, способный доставлять антигены в иммунокомпетентные клетки и активировать противовирусный и противоопухолевый иммунный ответ.

5. Стратегии создания противоопухолевых вакцин

Возникает идея использовать HSP для иммунизации пациентов с онкологическими заболеваниями для того, чтобы элиминировать опухоль средствами иммунной системы пациента, отказавшись или минимизировав химиотерапию, характеризующуюся тяжелыми и многочисленными побочными эффектами, в том числе угнетающую иммунную систему.

Первыми разработками в этом направлении являются так называемые «аутологичные вакцины», т.е. комплексы белков теплового шока с антигенами выделяются из удаленного опухолевого материала и вводят их оперированному пациенту подкожно. Проходящие в настоящее время клинические испытания этих разработок показали достаточно неплохие результаты. При эффективности, сопоставимой с классической химиотерапией, отмечается практически полное отсутствие системного побочного действия и лишь незначительные местные аллергические реакции. Основной проблемой аутологичных вакцин является зависимость количества выделяемой вакцины от размеров опухоли. Из большей массы опухоли возможно выделить большее количество индивидуальной вакцины. С другой стороны, увеличение размеров опухоли подвергает пациента дополнительному риску и приводит к глубокой иммуносупрессии. Это снижает эффективность последующей активной иммунотерапии. Данные противоречия приводят к ограничению числа пациентов, для которых может быть создана индивидуальная противоопухолевая вакцина, и в ряде случаев существенно снижают эффективность противоопухолевой терапии, что подтверждается результатами клинических испытаний [28]. Существует два пути преодоления проблемы недостаточного количества вакцины:

1. Использование суммы иммуногенных фракций опухоли (например, gp96, HSP90 и HSP70) [29]. Данный подход хотя и не снимает полностью указанной выше проблемы, но расширяет потенциально возможный спектр антигенных пептидов, изолируемых из опухоли (по сравнению с использованием индивидуального белка) и подразумевает нагрузку этими антигенами в условиях *in vivo*. Поэтому при изготовлении вакцины необходимо прикладывать усилия только для стабилизации образовавшихся комплексов. В то же время упомянутые белки в клетке могут выполнять (и выполняют) иные функции, нежели от них требуется при создании вакцины, и могут функционировать в неоптимальных для нагрузки антигенными пептидами условиях. Кроме того, вакцины, полученные данным способом, практически невозможно стандартизовать.

2. Создание вакцин на основе рекомбинантных белков теплового шока. Использование этого подхода практически полностью снимает пробле-

му недостаточного количества антигенного материала, однако сопряжено с множеством технологических трудностей. Подразумевается максимально возможный контроль над процедурами нагрузки рекомбинантного белка антигенными пептидами и стабилизации комплексов. С другой стороны, разрешение этих трудностей позволит оптимизировать условия нагрузки белка антигенами и создать стандартизируемую вакцину.

Для создания рекомбинантной вакцины целесообразно использовать именно HSP70, поскольку он обладает подходящими иммунологическими и биотехнологическими характеристиками.

Для создания вакцин важна стабильность комплексов и их количество в препаратах, но далеко не все антигенные пептиды обладают высоким сродством к HSP70 и для получения стойких комплексов с ними необходимо либо модифицировать эти пептиды, либо подбирать специфические условия нагрузки. В качестве одного из способов преодоления низкой аффинности пептидов к HSP70 можно рассматривать создание фьюжн-белков HSP70 с соответствующим антигеном. В этом случае создается соответствующая генно-инженерная конструкция и выделяется химерный белок, в котором антиген присоединен к HSP70 прочной пептидной связью и поэтому возможно осуществление доставки в АПК не только коротких пептидов, но и более крупных антигенных частиц, что позволяет уйти от МНС-рестрикции.

Фьюжн-белки, однако, имеют ряд недостатков. Во-первых, необходимо идентифицировать антиген, что достаточно часто удается в случае с вирусами и не всегда возможно в случае с опухолями. Во-вторых, крупные белковые частицы сами по себе являются сильными антигенами и возможна выработка антител к ним. Это в свою очередь может привести к появлению антител к эпитопам самого HSP70 и аутоиммунным заболеваниям впоследствии.

Модификация антигенных пептидов также предполагает идентификацию антигена и его искусственный синтез. Одной из исследовательских групп были созданы пептиды, обладающие высокой аффинностью к HSP70. На основе этих пептидов и известных последовательностей HLA-A2-рестриктированных антигенных пептидов были синтезированы гибридные пептиды, обладающие иммуногенностью и в то же время прочно связывающиеся с HSP70. Увеличение содержания пептида в препарате комплексов повысило способность данных препаратов стимулировать созревание цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов [30].

Последний способ – подбор соответствующих условий нагрузки – является наиболее трудным ввиду огромного разнообразия пептидов. Именно

поэтому данный подход должен базироваться на понимании механизмов функционирования белка HSP70, рассмотренных в данной главе. Полученный нами гибридный белок HSP70_{HYB} обладает свойствами, которые позволяют улучшить вакцины на основе HSP70. Совместное его применение с конститутивным HSC70 позволяет расширить захватываемый антигенный репертуар, а одинаковый коэффициент сопряжения доменов у этих белков позволяет стандартизовать получаемую вакцину по АТФ-азной активности.

В завершении главы, посвященной противоопухолевым вакцинам на основе белков теплового шока, необходимо отметить, что до сих пор полного излечения опухоли с использованием иммунотерапевтических методов добиться не удалось. Результаты исследований белков теплового шока, ведущихся уже около 50 лет, начавшихся с открытия группы генов у *Drosophila melanogaster*, представляют в настоящее время базу для создания мощного терапевтического инструмента, который сегодняшние студенты-первокурсники через 5–6 лет будут активно использовать.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение белкам теплового шока.
2. Опишите основные группы белков теплового шока.
3. Какова молекулярная структура конститутивного HSC70?
4. Как функционирует HSC70?
5. Как изменяется сродство индуцибельного HSP70_{A1B} и конститутивного HSC70 к пептидному субстрату при повышении концентрации ADP (АДФ)?
6. Как можно вычислить константы скоростей образования комплексов и равновесные константы диссоциации комплексов HSP70_{A1B} и HSC70 с мечеными FITC пептидами?
7. Как изучают влияние температуры и pH на эффективность образования комплексов рекомбинантных белков HSP70 с пептидами, мечеными флуоресцентной меткой FITC?
8. Охарактеризуйте шаперонную систему HSP60 и укажите условия для ее функционирования.
9. Какие две основные системы в клетках эукариот служат для разрушения белков?
10. Какова внеклеточная роль шаперонов?
11. Обоснуйте биохимические подходы для практического использования шаперонов.

Литература

1. Figlin, R.A. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma / R.A.Figlin [et. al.] // J. Clin. Oncol. – 1999. – Vol. 17, № 8. – P. 2521–2529.
2. Liyanage, U.K. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma / U.K. Liyanage [et. al.] // J. Immunol. – 2002. – Vol. 169, № 5. – P. 2756–2761.
3. Luo, W. Heat shock protein 90: translation from cancer to Alzheimer's disease treatment? / W. Luo, A. Rodina, G. Chiosis // BMC Neurosci. – 2008. – Vol. 9, Suppl 2. – S. 7.
4. Wainberg, Z. Modulation of stress protein (hsp27 and hsp70) expression in CD4+ lymphocytic cells following acute infection with human immunodeficiency virus type-1 / Z. Wainberg [et. al.] // Virology. – 1997. – Vol. 233. – P. 364–373.
5. Yu, M. DNA vaccines for cancer too / M. Yu, O.J. Finn // Cancer Immunol Immunother. – 2006. – Vol. 55, № 2. – P. 119–130.
6. Vyas, J.M. The known unknowns of antigen processing and presentation / J.M. Vyas [et. al.] // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – Vol. 8, № 8. – P. 607–618.
7. Vos, M.J. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families / M.J. Vos [et. al.] // Biochemistry. – 2008. – Vol. 47, № 27. – P. 7001–7011.
8. Banecki, B. Real time kinetics of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone machine action / B. Banecki, M. Zylicz // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271. – P. 6137–6143.
9. Basu, S. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin / S. Basu, R.J. Binder, T. Ramalingam, P.K. Srivastava // Immunity. – 2001. – Vol. 14(3). – P. 303–313.
10. Варфоломеев, С.Д. Биокинетика: практический курс / С.Д. Варфоломеев, К.Г. Гуревич. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999 – 720 с.
11. Moroi, Y. Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70 / Y. Moroi [et. al.] // PNAS. – 2000. – Vol. 97. – P. 3485–3490.
12. Молекулярная патология белка / под ред. член-корр. АМН Украины, проф. Д.И. Заболотного. – Киев: Логос. – 2008. – 236 с.
13. Cancer Immunotherapy: immune suppression and tumor growth / ed. by G.C. Prendergast, E.M. Jaffee. – Acad. Press. – 2007. – 409 p.

14. Мейл, Д. Иммунология / Д. Мейл, Дж. Бростофф, Д.Б. Рот, А. Ройт; пер. с англ. – М.: Логосфера, 2007. – 568 с.
15. Marini, M. Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes / M. Marini, F. Frabetti, D. Musiani, C. Franceschi // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1996. – Vol. 70. – P. 337–350.
16. Matz, J.M. Adrenergic regulation of the heat shock response in brown adipose tissue / J.M. Matz, K.P. LaVoi, M.J. Blake // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1996. – Vol. 277. – P. 1751–1758.
17. Nickel, W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells / W. Nickel // *Traffic.* – 2005. – Vol. 6. – P. 607–614.
18. Guzhova, I. *In vitro* studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance / I. Guzhova [et. al.] // *Brain Res.* – 2001. – Vol. 914. – P. 66–73.
19. Broquet, A.H. Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release / A.H. Broquet [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 21601–21606.
20. Denzer, K. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device / K. Denzer [et al] // *J. Cell. Sci.* – 2000. – Vol. 113, Pt 19. – P. 3365–3374.
21. Zitzler, S. Distinct binding sites for the ATPase and substrate-binding domain of human Hsp70 on the cell surface of antigen presenting cells / S. Zitzler [et. al.] // *Mol. Immunol.* – 2008. – Vol. 45(15). – P. 3974–3983.
22. Adachi, H. Endothelial scavenger receptors / H. Adachi, M. Tsujimoto // *Prog. Lipid Res.* – 2006. – Vol. 45(5). – P. 379–404.
23. Becker, T. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes / T. Becker, F.U. Hartl, F. Wieland // *J. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 158(7). – P. 1277–1285.
24. Kumar, S. Hsp70 induces Th1 polarization through tumor-associated macrophages in a T-cell lymphoma / S. Kumar, P. Deepak, A. Acharya // *Neoplasma.* – 2007. – Vol. 54(2). – P. 113–122.
25. Gastpar, R. The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells / R. Gastpar [et. al.] // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172(2). – P. 972–980.
26. Bendz, H. Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling / H. Bendz [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282(43). – P. 1688–1702.

27. Chen, T. Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway / T. Chen [et. al.] // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182(3). – P. 1449–1459.
28. Wood, C. An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial / C. Wood [et. al.] // Lancet. – 2008. – Vol. 372(9633). – P. 145–154.
29. Udono, H. Heat shock protein 70-associated peptides elicit speci. cancer immunity / H. Udono, P.K. Srivastava // J. Exp. Med. – 1993. – Vol. 178. – P. 1391–1396.
30. Flechtner, J.B. High-affinity interactions between peptides and heat shock protein 70 augment CD8+ T lymphocyte immune responses / J.B. Flechtner [et. al.] // J. Immunol. – 2006. – Vol. 177(2). – P. 1017–1027.

Г Л А В А 9. ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ЭФФЕКТОВ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Многие из аспектов действия ионизирующих излучений (ИИ) на организм хорошо изучены. За последнее десятилетие раскрыты некоторые из фундаментальных механизмов, лежащих в основе реализации биологических эффектов воздействия ИИ. Тем не менее, наши представления о биохимических, генетических и эпигенетических механизмах формирования отдаленных последствий облучения, а также о реализации эффектов *малых доз* ионизирующих излучений являются неполными и фрагментарными.

По-видимому, механизмы формирования этих эффектов намного сложнее, чем мы их представляем на сегодняшний день, и помимо прямого повреждения клеток включают в себя воспалительные реакции, нарушение микроциркуляции и клеточного гомеостаза тканей [1].

1. Типы радиобиологических эффектов

По современной классификации *радиобиологические эффекты* разделяются на две категории: *детерминированные* и *стохастические* эффекты облучения [2]. Классификация радиационных эффектов, принятая в отечественной радиобиологии, приводится в табл. 9.1.

Детерминированные, или закономерно развивающиеся, эффекты облучения – это патологические состояния организма, которые характеризуются развитием основных симптомокомплексов лучевой болезни в ранний пострadiационный период и склеротическими изменениями тканей в отдаленный период после воздействия ИИ. Данный тип радиационных эффектов имеет пороговый характер проявления и развивается, как правило, при величине поглощенной дозы выше 1 Зв (0,15 Зв для катаракты). Скорость развития этих эффектов и тяжесть проявления пропорциональны поглощенной дозе ИИ, т.е. чем выше доза, тем более выраженные поражения органов и тканей наблюдаются в облученном организме. Примерами детерминированных радиационных эффектов являются лучевая болезнь I, II, III и IV степени, катаракта, бесплодие (радиационная стерилизация).

Как видно из рис. 9.1, в отличие от детерминированных стохастические, или вероятностные, эффекты облучения теоретически могут развиваться при сколь угодно малом воздействии ИИ. При этом выраженность данных эффектов не зависит от величины поглощенной дозы. Фактически увеличение поглощенной дозы ИИ может увеличить только вероятность возникновения патологии, но не ее выраженность.

Таблица 9.1 – Основные эффекты облучения человека [2]

Доза	Категории эффектов, примеры	Примечания
До 0,2 Гр	Квазидетерминированные эффекты: краткосрочная лимфо- и лейкопения	Клинически незначимы
> 0,2– < 5 Гр для ранних и отсроченных эффектов, десятки Гр – для поздних	Детерминированные эффекты: а) ранние, вскоре после облучения – поражения кожи – эритема, ожог, язва; б) отсроченные, спустя месяцы, годы – стерильность, катаракта, нефро-, кардиосклероз; в) поздние, спустя годы, при больших дозах – фиброзы, нейропатии, поражения костей	Клинически значимы, их степень зависит от дозы при местном и общем облучении
0,1–1 Гр	Поздние детерминированные эффекты при малых дозах: различные функциональные нарушения сердечно-сосудистой, нервной и других систем, отмеченные через 50 лет среди японцев, переживших атомную бомбардировку	Радиационная природа подобных эффектов нуждается в подтверждении и изучении
Теоретически при любой дозе	Стохастические эффекты: а) злокачественные новообразования (ЗНО) – рак и лейкозы, регистрируются спустя годы, десятки лет; б) генетические (наследственные) эффекты в потомстве, обнаруживаются сразу после рождения	Практически риск ЗНО отмечен после 0,5 Гр, генетические эффекты у человека пока не зарегистрированы
< 0,1 Гр (доза облучения плода)	Тератогенные эффекты: различные пороки развития и уродства, возникшие в результате облучения плода на разных стадиях закладки того или иного органа	Будучи пороговыми по дозе, относятся к детерминированным, а по вероятности проявления того или иного эффекта – к стохастическим

Обычно стохастические эффекты проявляются при хроническом воздействии радиационного фактора или в отдаленный период после острого облучения. Дословный перевод термина «стохастический» означает случайный, т.е. этот тип эффектов не обязательно проявляется в облученном организме.

Развитие лейкозов, опухолей и генетических дефектов в отдаленный пострадиационный период является типичным примером стохастических эффектов облучения. Несмотря на сложность дифференцировки стохастических

ческих эффектов малых доз ИИ от эффектов других средовых факторов (табакокурение, алкоголь, диета, заболевания) общепризнанными являются следующие отличительные черты стохастических эффектов: отсутствует порог дозы, ниже которого не проявляются эти эффекты; от величины поглощенной дозы зависит частота проявления, но не выраженность эффекта.

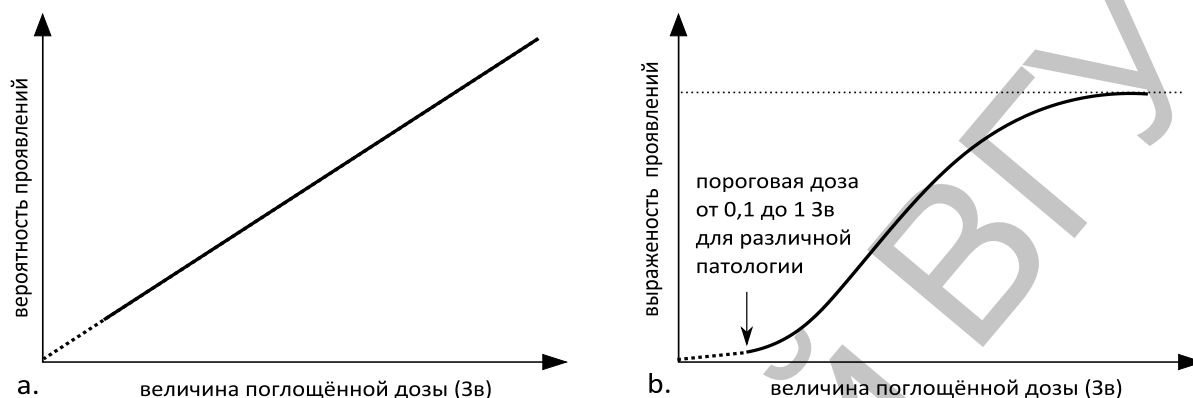


Рис. 9.1. Закономерности проявления стохастических (а) и детерминированных (б) эффектов воздействия ионизирующих излучений в зависимости от величины поглощенной дозы.

Следует упомянуть, что подразделение некоторых эффектов облучения на стохастические и детерминированные условно. Так, развитие радиогенной катаракты, сердечно-сосудистой патологии и нейродегенеративных заболеваний относят к детерминированным эффектам облучения, однако если учесть зависимость эффекта от возраста и биохимического статуса организма, то можно рассматривать развитие этих патологий в ключе увеличения вероятности их возникновения [3].

2. Механизмы развития радиационных эффектов

В основе развития стохастических и детерминированных эффектов облучения лежат различные биологические механизмы. Тем не менее, первичные события, приводящие к столь различным последствиям одинаковы (табл. 9.2).

Первые три *стадии лучевого поражения* (физическая, физико-химическая и химическая) принято относить к первичным (добиологическим) стадиям взаимодействия ИИ и вещества, так как они характерны как для живых организмов, так и для химических соединений, их растворов и смесей.

Четвертая стадия – биологическая – связана с повреждением клеток, тканей и органов. Процессы повреждения и регенерации тканей организма,

преобладающие на этой стадии, определяют характер ответных реакций организма на радиационное воздействие.

Таблица 9.2 – Основные стадии в действии ионизирующих излучений на биологические системы [Основы медицинской радиобиологии. СПб., 2004]

Стадия	Процессы	Продолжительность
Физическая	Поглощение энергии излучения; образование ионизированных и возбужденных атомов и молекул	10^{-16} – 10^{-15} с
Физико-химическая	Перераспределение поглощенной энергии внутри молекул и между ними, образование свободных радикалов	10^{-14} – 10^{-11} с
Химическая	Реакции между свободными радикалами и между ними и интактными молекулами. Образование широкого спектра молекул с измененными структурой и функциональными свойствами	10^{-6} – 10^{-3} с
Биологическая	Последовательное развитие поражения на всех уровнях биологической организации; от субклеточного до организменного; развитие процессов биологического усиления и репарационных процессов	Секунды–годы

По характеру взаимодействия ИИ с биологическими молекулами принято различать *прямое* и *непрямое* (косвенное) действие ИИ. При этом подразумевается, что прямое действие радиации ассоциировано с первичными ионизационными событиями, которые происходят непосредственно в биологических мишенях (ДНК, липиды, белки, углеводы и т.д.). А под непрямым действием подразумевается повреждение вышеуказанных мишеней вследствие взаимодействия с продуктами радиолиза окружающей их воды, которая может составлять до 90% массы живой клетки. Так, например, прямое действие ИИ ответственно за 10–20% лучевого поражения макромолекул ДНК, а косвенное действие ИИ ответственно за 80–90%. При этом внесение различных химических агентов может ослаблять или усиливать косвенное действие радиации. Это свойство используется для разработки радиопротекторов и сенсibilизаторов для модификации радиационных эффектов.

Биологическая стадия действия радиации – это сложный многоступенчатый процесс ответа организма на полученные повреждения, который сопровождается гибелью клеток и регенерационными процессами. Вовле-

чение всех систем организма в стресс-адаптационный ответ на повреждение приводит к тому, что радиационные эффекты могут развиваться как в облученных, так и в необлученных органах и тканях. В этой связи выделяют *прямые* и *опосредованные* биологические эффекты облучения.

Прямые эффекты развиваются в тканях и органах после непосредственного воздействия радиации и обусловлены гибелью наиболее чувствительных клеточных элементов ткани. Как правило, это наиболее быстро делящиеся клетки-предшественники и стволовые клетки (кроветворные, кишечные, мезенхимальные и т.д.). Именно массовая гибель и последующее восстановление популяции этих клеток определяет динамику нарушений функционирования тканей в пострадиационный период. Примером может служить формирование *костномозгового (кроветворного) и желудочно-кишечного* синдромов острой лучевой болезни. Третий тип синдрома – *церебральный*, развивается при остром лучевом поражении в очень высоких дозах (от 10 до 100 Зв). Развитие этого синдрома связано с интерфазной гибелью относительно радиоустойчивых клеток нервной системы.

Помимо описанных выше прямых эффектов облучения, характерных для высоких доз, при хроническом облучении в малых дозах, а также при частичном облучении тела в клетках, тканях, органах и системах организма, не подвергнутых непосредственному облучению, наблюдаются радиационные эффекты, называемые опосредованными. В зарубежной литературе эти эффекты часто называются *немишенными* (с англ. *untargeted*). Подразумевается, что эти эффекты облучения проявляются без непосредственного воздействия ИИ на биологические мишени [3, 4].

Не следует путать механизмы действия ИИ и биологические эффекты этого действия. Прямое и косвенное действие ИИ – это различные механизмы поражения биологически значимых мишеней, а прямые и опосредованные эффекты облучения – это результат ответа организма на первичные повреждения.

3. Феномены опосредованных и непрямых радиационных эффектов

Воздействие ионизирующих излучений на организменном уровне значительно отличается от эффектов, выявленных в культурах клеток *in vitro*, и сопровождается развитием таких феноменов, как *адаптивный ответ, эффект свидетеля, нестабильность генома*, которые, по сути, являются проявлением системной стресс-адаптационной реакции организма, систем органов и отдельных тканей на воздействие повреждающего фактора.

Радиационно-индуцированный адаптивный ответ – это реакция биологических объектов, которая заключается в том, что после воздействия ионизирующего излучения в малых (адаптирующих) дозах при повторном облучении в больших (проявляющих) дозах радиобиологический эффект от повторного облучения понижается. Т.е. облучение в малой дозе может вызвать повышение радиоустойчивости биологических объектов.

Эффект свидетеля заключается в поражении клеток, находящихся вне зоны воздействия радиации, но контактирующих с облученными клетками или со средой их обитания. Например, в 1954 г. впервые наблюдали индукцию хромосомных aberrаций костного мозга грудины людей после облучения селезенки, а в 1967 г. впервые была описана индукция хромосомных aberrаций в лимфоцитах, культивируемых на плазме, взятой у людей, подвергнутых противоопухолевой лучевой терапии. С 1980-х годов и по настоящее время ученые проводят экспериментальный поиск факторов (веществ), которые передают «сигналы» от клеток, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения, клеткам, не подвергнутым непосредственному облучению, вызывающие у последних радиационные поражения. Выявлено, что эти факторы имеют пептидную природу и влияют на изменение проницаемости клеточных мембран, вызывая гибель интактных клеток и снижение их клоногенного потенциала.

Генетическая нестабильность. В результате непосредственного поражения генома излучением и дополнительного поражения продуктами измененного клеточного метаболизма у потомков облученных клеток в течение многих поколений (до 10–30 генераций и более) сохраняются отклонения в строении и функционировании генетического аппарата, ДНК-белкового комплекса: наблюдается повышенный уровень мутаций и повышенная частота хромосомных перестроек. Механизм индукции и поддержания генетической нестабильности мало изучен. В развитии генетической нестабильности играет роль не только ДНК, но и иные структуры (нарушения метаболизма клеток). Так, эксперименты показали, что облучение цитоплазмы приводит к учащению появления точечных мутаций, а облучение ядра – к учащению хромосомных перестроек.

Среди других опосредованных эффектов облучения, регистрируемых на уровне организма, дополнительно стоит упомянуть угнетение иммунитета (повышенная чувствительность к возбудителям инфекционных заболеваний, изменение микрофлоры организма, ОРЗ и воспалительные заболевания), нарушение обмена веществ (нарушения белкового, углеводного, липидного обмена; ингибирование окислительного фосфорилирования), нервно-психические расстройства (искажение межнейронных и межсис-

темных связей, расстройства поведения, сна, судороги, припадки). В основе развития этих эффектов лежат изменения, регистрируемые на уровне клетки: потеря клоногенного потенциала, образование микроядер, повышение частоты хромосомных aberrаций, повышенная вероятность гибели потомков облученных клеток.

Механизмы формирования этих эффектов еще далеки от полной расшифровки. Известно, что в основе развития этих, зачастую неспецифических эффектов, лежат сигнальные каскады, запускаемые первичными повреждениями и ионизационными событиями. Тем не менее, динамика и характер наблюдаемых изменений зависят от реакций организма на повреждение на всех уровнях организации. Молекулярные механизмы, вовлеченные в стресс-сигнализацию клетки и влияющие на репарацию повреждений ДНК, подробно рассмотрены в обзоре В.К. Мазурик и др. [5]. Авторы провели тщательный анализ накопленных данных и пришли к выводу, что воздействие ИИ приводит к нарушению в системах организма, обеспечивающих окислительно-восстановительный гомеостаз, механизмы репарации ДНК и контроль клеточного цикла в сверхочных точках (с англ. check points). При этом носителями сигнала могут выступать маркеры повреждения клеток, протеолитические ферменты, продукты окислительного стресса, про-воспалительные цитокины и хемокины, а также активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА).

В связи с этим в настоящее время особое внимание уделяется состоянию клеток, участвующих в развитии и разрешении воспалительной реакции, – тканевых резидентных макрофагов. В частности их способности продуцировать АФК, АФА и другие токсичные для клеток метаболиты. Наряду с провоспалительными цитокинами эти высокореактивные соединения могут вызывать повреждения ДНК, модифицировать белки, инициировать процессы перекисного окисления липидов, а также являются *кластогенными факторами* (веществами, способными вызывать состояние геномной нестабильности в необлученных клетках). Последние исследования в этой области подтвердили связь скорости соматического мутагенеза и вероятности возникновения лейкозов с изменениями в эндогенной продукции АФА. Так, английскими учеными было установлено, что вероятность возникновения лейкозов у облученных мышей в отдаленный пострадиационный период зависит от уровня продукции АФА макрофагами костного мозга [6]. Российские ученые обнаружили, что частота мутантных форм лимфоцитов у работников атомной промышленности была связана с уровнем продукции АФА лейкоцитами [7].

4. Процессы перекисного окисления, связь с развитием опосредованных радиобиологических эффектов

Важную роль в развитии стресс-адаптационной реакции организма на воздействие, в том числе и на радиационное, играют процессы перекисидации. Первичные ионизационные события вызывают каскад свободно-радикальных реакций, что сопровождается окислительным повреждением биомолекул (липидов, белков, углеводов и ДНК). Особое место в этом процессе занимает перекисное окисление липидов (ПОЛ), так как индукция процессов ПОЛ при воздействии ИИ является одним из важнейших механизмов реализации эффектов облучения. Свободнорадикальное повреждение липидов в составе клеточных мембран приводит к нарушению их целостности и, соответственно, нарушаются энергетические процессы клетки, передача сигналов, и часто эти изменения становятся причиной гибели клетки посредством развития некроза или апоптоза.

Другим аспектом реакция ПОЛ является образование форм альдегидов, которые могут модифицировать белки, инактивировать активные центры ферментов. Также многие продукты перекисного окисления липидов обладают мутагенными и канцерогенными свойствами благодаря способности вступать в реакции с нуклеиновыми кислотами.

Эти соединения часто рассматриваются как радиотоксины, так как их введение необлученным животным способно воспроизводить ряд биологических эффектов облучения. В то же время продукты ПОЛ являются маркерами клеточного повреждения и в определенных концентрациях могут служить сигнальными молекулами для развития адаптивного ответа организма и других тканевых элементов.

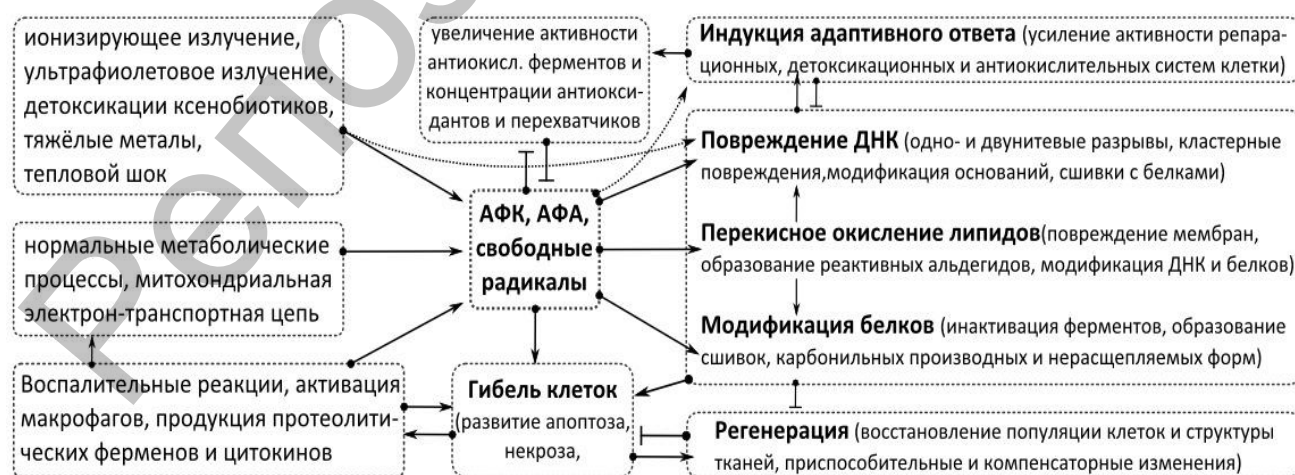


Рис. 9.2. Схема инициации процессов ПОЛ и их участия в реализации опосредованных эффектов воздействия ионизирующего излучения.

Общепринятыми и наиболее доступными методами для лабораторного оценки интенсивности ПОЛ являются спектрофотометрические методы определения концентрации диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в жидкостях и тканях организма. В отдельных случаях определяют концентрацию липоперекисей, гидроперекисей, 4-гидроксинонеала, акролеина, а также карбонильных производных и оснований Шиффа и других продуктов взаимодействия с белками. При оценке состояния перекисных процессов важным является также оценка активности звеньев антиоксидантной системы. Интегральную характеристику баланса этих систем дает оценка соотношения восстановленного и окисленного глутатиона.

5. Перекисное окисление липидов и эндогенная продукция свободных радикалов в пострadiaционный период

Как уже упоминалось в предыдущем разделе, действие ИИ индуцирует каскад свободно-радикальных реакций, приводящих к интенсификации процессов пероксидации. Ранее нами было установлено, что изменения интенсивности процессов ПОЛ в пострadiaционный период носят немонотонный циклический характер (рис. 9.3). В ранние сроки наблюдается характерный радиационно-индуцированный пик повышения концентрации продуктов ПОЛ с последующей нормализацией и даже снижением относительно контроля. Однако на протяжении второго месяца после облучения наблюдается повторное повышение уровня продуктов ПОЛ в сыворотке крови. Этот феномен был назван нами «вторичным окислительным стрессом» в связи с тем, что этот эффект не является следствием прямого воздействия ИИ и развивается на фоне нормализации первичных радиационно-индуцированных изменений. Интересно, что время проявления этого эффекта совпадает по срокам с максимальным риском индукции лейкозов в модели радиационного канцерогенеза у грызунов.

На рис. 9.3 приводится принцип метода определения малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой. Подробно методы определения продуктов ПОЛ, окисленного и восстановленного глутатиона, а также активности антиоксидантных систем описаны в книгах В.С. Камышиникова «Методы клинических лабораторных исследований» (2009) и А.А. Чиркина «Клинический анализ лабораторных данных» (2005).

Следующим этапом исследований стало выяснение причин интенсификации процессов перекисного окисления и накопления конечных продуктов ПОЛ в сыворотке крови. Процессы ПОЛ в организме происходят не только при воздействии радиации. ПОЛ может быть инициировано АФК и АФА, которые вырабатываются при нормальных физиологических процес-

сах (дыхание, воспалительные реакции, микросомальное окисление). Основными источниками свободных радикалов в организме являются электрон-транспортная цепь, а также профессиональные фагоциты (гранулярные лимфоциты, моноциты, полостные и тканевые макрофаги). Эти клетки помимо основной функции – обеспечения неспецифического иммунитета – являются источником свободных радикалов и играют значительную роль в патогенезе сердечнососудистых, воспалительных и нейродегенеративных заболеваний. Для выяснения потенциальной роли фагоцитов в развитии окислительного стресса мы исследовали показатели окислительного метаболизма резидентных перитонеальных макрофагов на 3, 10, 30, 90 и 180 сутки после облучения гамма-лучами в дозе 1 Гр.

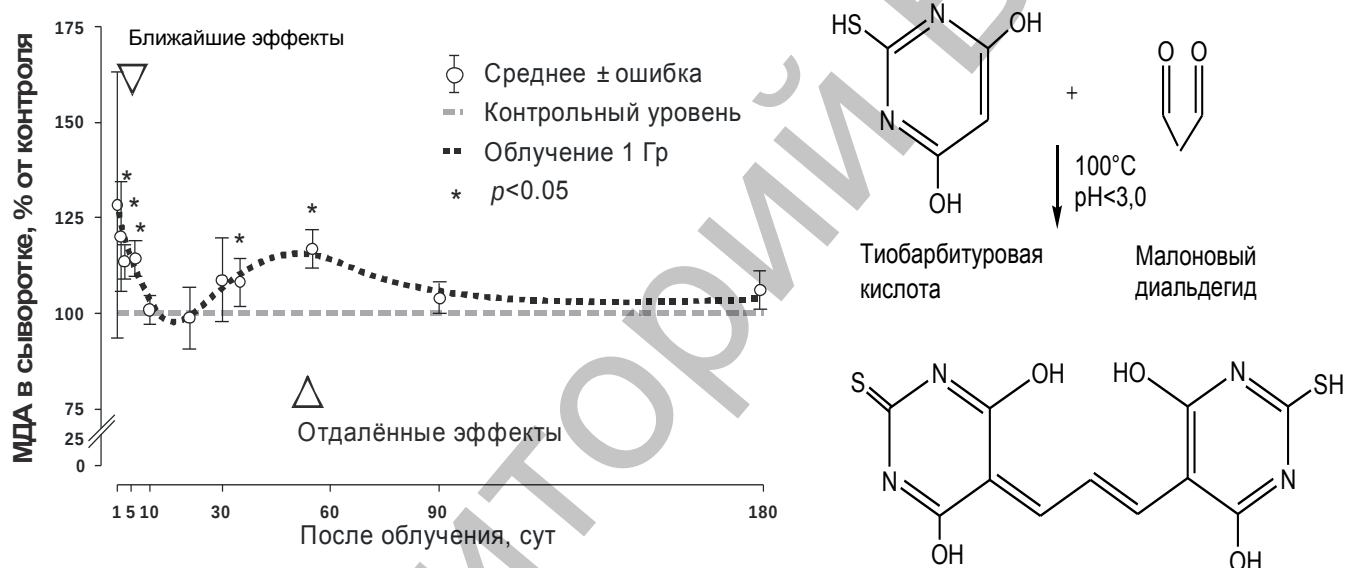


Рис. 9.3. Динамика уровня продуктов перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид) в сыворотке крови облученных крыс. Схема определения продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

Было установлено, что восстановление организма в отдаленный период сопровождается значительными изменениями показателей резидентных перитонеальных макрофагов (рис. 9.4). В том числе была зафиксирована инфильтрация лейкоцитов в перитонеальную полость у облученных животных и увеличение базальных уровней продукции АФК и АФА перитонеальными макрофагами. Динамика этих показателей совпадала с уровнем продуктов ПОЛ в сыворотке крови, что свидетельствует о важной роли продукции свободных радикалов тканевыми макрофагами при развитии отдаленных эффектов облучения.

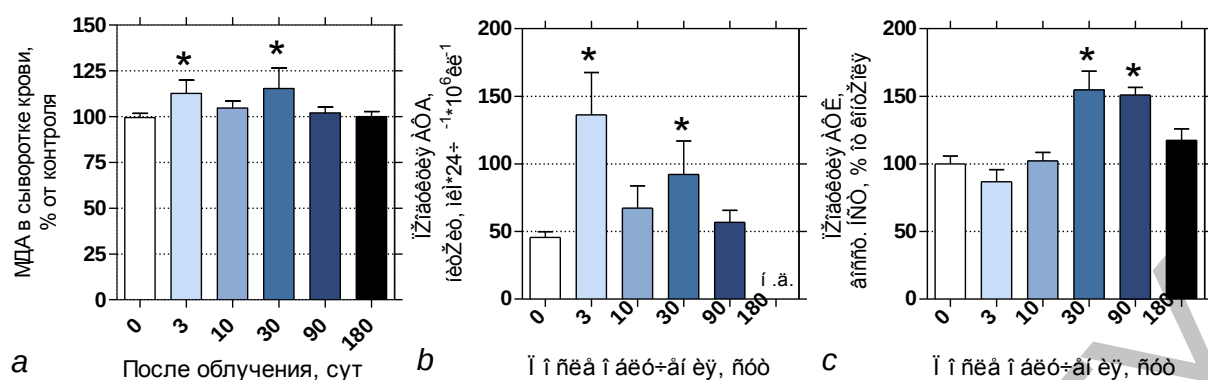


Рис. 9.4. Динамика уровня продуктов ПОЛ (а) в сыворотке крови и уровня базальной продукции перитонеальными макрофагами АФА (b) и АФК (c) после облучения в дозе 1 Гр. Отличия от контроля достоверны при * $p < 0,05$ (Mann Whitney U-test).

6. Методология исследований окислительного метаболизма фагоцитов

За историю клеточной биологии разработано большое количество подходов и методов изучения продукции свободных радикалов клетками различной локализации. Существуют флуоресцентные, люминесцентные и спектрофотометрические методы с различной специфичностью, чувствительностью и точностью. Для поисковых и скрининговых целей хорошо подходят спектрофотометрические методы с невысокой специфичностью, т.к. они позволяют выявить усиление продукции целого спектра соединений, способных провоцировать окислительный стресс в организме. Примерами могут служить методы определения продукции АФК с применением солей тетразолия и определения продукции АФА по наработке нитрита и нитрата в культурах клеток. Более детальную картину изменений метаболических показателей клеток дают методы с применением высокоспецифичных зондов и с регистрацией сигналов при помощи ядерного магнитного резонанса, проточной цитометрии и конфокальной микроскопии.

Для оценки состояния окислительного метаболизма фагоцитов используют модель, основанную на изучении функциональных показателей резидентных перитонеальных макрофагов белых крыс без стадий очистки (лизиса примеси эритроцитов, центрифугирования, ресуспензирования), т.е. в присутствии аутологичных тканевых факторов и других типов клеток перитонеальной полости, участвующих в кооперационных взаимодействиях при формировании функционального ответа на различные воздействия. Таким образом, функциональные показатели клеток оцениваются в условиях максимально приближенных к живому организму – в системе *ex vivo* в различные сроки после воздействия изучаемого фактора *in vivo*.

Получение первичных культур клеток. Общую популяцию резидентных клеток перитонеальной полости выделяют при помощи лаважа (перитонеального смыва), используя раствор Хенкса (pH 7,4) с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} , без фенолового красного (0,5% Antibiotic Antimycotic Solution 100×, A5955, Sigma; 10 mM HEPES, Promega; гепарин 2,5 ед./мл). Определяют концентрацию клеток и используют в дальнейшем для нормализации и расчета удельных показателей. Для проведения исследований желательно, чтобы концентрация клеток находилась в пределах $1-5 \times 10^6$ на мл, оптимальной является концентрация 2×10^6 кл/мл.

Суммарную метаболическую активность клеток оценивают по скорости восстановления неспецифического зонда 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ, M5655, Sigma). В результате реакции образуется ярко окрашенное соединение формазан, растворимое только в органических растворителях. В этом тесте изменение оптической плотности на длине волны 570 нм пропорционально интенсивности энергетических процессов клетки и количеству клеток в пробирке.

Для постановки теста в ячейки 96-луночного планшета вносят 100 мкл клеточной суспензии (0,5 мл в пробирки). Прибавляют равный объем раствора Хэнкса, подогретого до 37 °С и содержащего МТТ в концентрации 1 мг/мл. После 2-часовой инкубации клеток при 37 °С и 5% CO_2 удаляют инкубационную среду, максимально сохраняя клеточный слой (декантируют или аспирируют, пробирки предварительно центрифугируют). В ячейки планшета вносят 200 мкл (в пробирки 1 мл) смеси этанол:диметилсульфоксид (1:1), перемешивают для полной экстракции формозана, если необходимо центрифугируют и измеряют оптическую плотность на длине волны 570 нм с коррекцией на 650 нм. Результаты представляют как изменение оптической плотности за час в расчете на 1 млн клеток.

Уровень продукции АФК в свежевыделенных резидентных перитонеальных макрофагах оценивают по скорости восстановления специфичного к супероксидрадикалу зонда – 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT sodium salt, X4251, Fluka). В отличие от применяемого ранее для этих целей нитросинего тетразолия, при восстановлении этой соли тетразолия образуется водорастворимый формазан, что позволяет производить прямые измерения без экстракции и органических растворителей. В этом тесте изменение оптической плотности на длине волны 450 нм пропорционально интенсивности продукции АФК клетками (преимущественно супероксидрадикала) и количеству клеток в пробирке. Оценивают как базальную (нестимулированную), так и стимулированную форболовым эфиром (33 нМ, PMA, P1585, Sigma) и/или зимозаном (0,25 мг/мл,

Zymosan A, Z4250, Sigma) продукцию АФК. Рассчитывают коэффициенты стимуляции, характеризующие функциональный ответ клеток на воздействие патогена – способность отвечать усилением продукции АФК.

Для постановки теста в ячейки 96-луночного планшета вносят 100 мкл клеточной суспензии (0,5 мл в пробирки). Прибавляют равный объем раствора Хэнкса, подогретого до 37 °С и содержащего ХТТ в концентрации 125 mM (0,083 мг/мл). После 2-часовой инкубации клеток при 37 °С и 5% измеряют оптическую плотность на длине волны 450 нм с коррекцией на 650 нм. Результаты представляют как изменение оптической плотности за час в расчете на 1 млн клеток.

Определение уровня продукции АФА основано на свойстве АФА метаболизироваться в биологических системах с образованием нитрит и нитрат ионов. Уровень базальной и стимулированной эндотоксином (LPS *E. coli* L4391 или L2880, Sigma) продукции АФА определяют по уровню накопления нитрита в суточных культурах перитонеальных клеток.

Метод основан на способности нитрита в кислой среде азотировать сульфаниламид, а последующая реакция диазосочетания с нафтилендиамином приводит к образованию водорастворимого диазокрасителя. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации нитрита и определяется спектрофотометрически при длине волны 560 нм.

Для постановки теста в ячейки 96-луночного планшета вносят 100 мкл клеточной суспензии (0,5 мл в пробирки). В ячейки для определения базальной продукции АФА прибавляют равный объем полной культивационной среды без фенолового красного (D5921, DMEM, Sigma; 5% FBS, Invitrogen; 1% Antibiotic Antimycotic Solution 100×, A5955, Sigma). В ячейки для определения стимулированной продукции АФА прибавляют такой же объем полной среды, содержащей эндотоксин (250 нг/мл) или зимозан (0,5 мг/мл). Культуры клеток инкубируют в течение 24-х часов при 37 °С и 5% CO₂. Образцы среды из пробирок (200 мкл) переносят в ячейки планшета, если культивирование происходило в планшете, то непосредственно в ячейки с культурами вносят 150 мкл реактива Грисса. Реактив готовят непосредственно перед определением, смешивая равные части 1% сульфаниламида (S9251, Sigma-Aldrich) и 0,1% N-(1-naphthyl)-ethylendiamine (N9125, Aldrich) в 5% H₃PO₄. Для повышения чувствительности реакции вдвое раствор сульфаниламида можно заменить 0,35% раствором 4,4'-Diaminodiphenyl sulfone (A74807, Aldrich).

Измеряют оптическую плотность на длине волны 570 нм с коррекцией на 650 нм. Для расчета концентрации нитрита используют калибровочную кривую, построенную по нитриту натрия, которая имеет линейную харак-

теристику от 1 до 100 мкМ. Результаты представляют как количество нитрита, наработанного в культуре за 24 часа в расчете на 1 млн клеток. Дополнительно рассчитывают коэффициенты стимуляции, характеризующие функциональный ответ клеток на воздействие патогена – способность отвечать усилением продукции АФА.

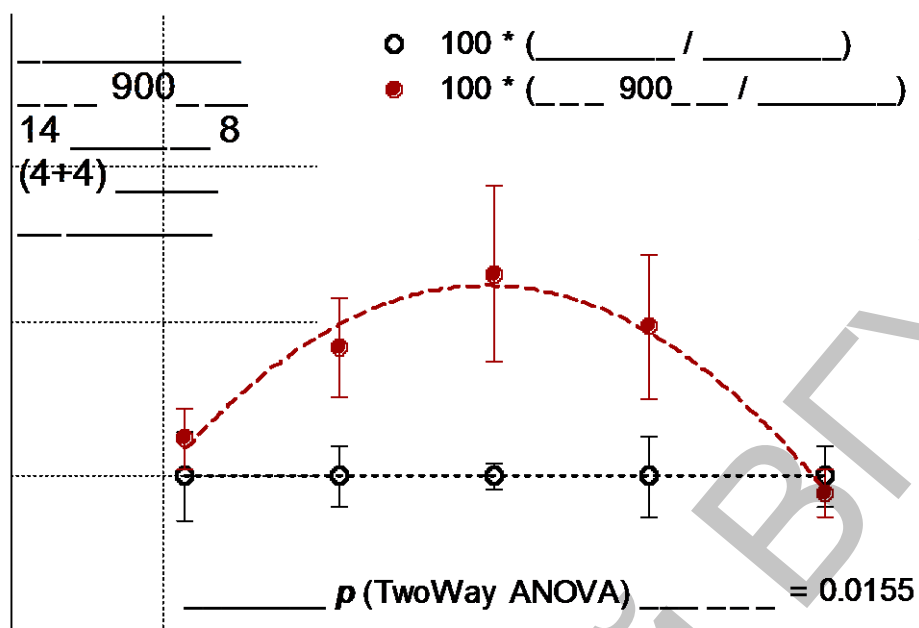
7. Области применения методов оценки состояния окислительного метаболизма тканевых макрофагов

Разработанная и предоставленная методология исследований может быть использована при оценке биологических эффектов воздействия различных факторов на организм. Описанные методы были применены для оценки состояния окислительного метаболизма тканевых макрофагов различной локализации при исследованиях влияния хронического и острого облучения ИИ, излучений сотовых телефонов, а также в моделях диабета и стерильного перитонеального воспаления. Так, например, с помощью описанных методов было установлено транзиторное увеличение продукции АФА и АФК перитонеальными макрофагами крыс Вистар в период после отмены действия излучений сотовых телефонов (рис. 9.5).

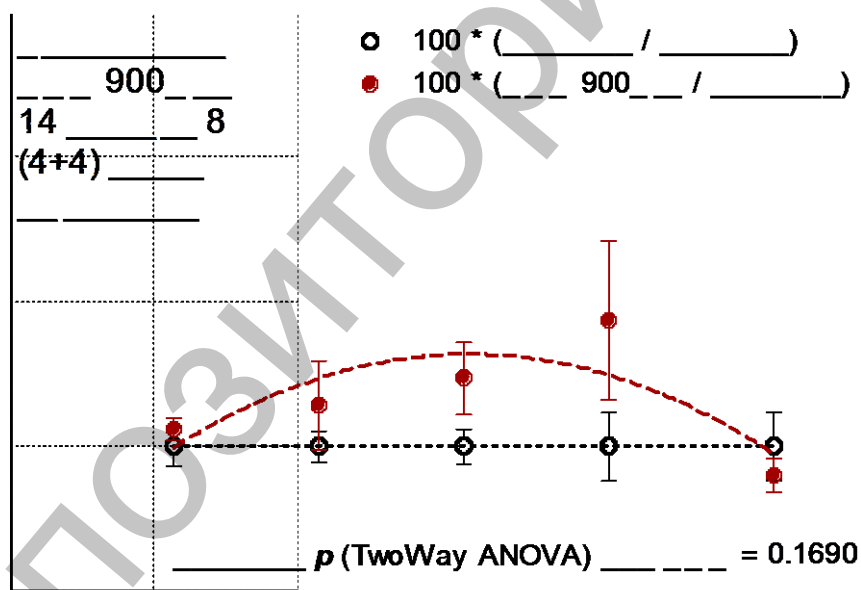
Также при помощи этой методологии удалось выявить, что изменения в окислительном метаболизме клеток наблюдаются не только в перитонеальной полости, но и в костном мозге облученных животных и их потомков (рис. 9.6).

В заключение следует отметить, что представленная методология исследований разработана для скрининговой оценки показателей окислительного метаболизма фагоцитов, т.е. для выявления общих закономерностей и изменений на уровне целостного организма при воздействии изучаемого фактора *in vivo*. При этом основным критерием отбора методов являлись скорость и доступность выполнения тестов при сохранении общей информативности. Микропланшетный формат позволяет масштабировать исследования и анализировать одновременно десятки образцов.

Описанная методология позволяет оценить базальный и стимулированный компонентами клеточных оболочек бактерий и грибов уровень продукции АФА и АФК клетками различной локализации (клетки костного мозга, мононуклеарные лейкоциты крови, альвеолярные и перитонеальные макрофаги). Описанный подход может быть использован при тестировании влияния фармакологических средств и др. субстанций или композиций на продукцию АФА, а также при проведении исследований медико-биологического профиля для изучения биологических эффектов воздействия факторов различной природы на организм *in vivo*.



a)



б)

Рис. 9.5. Динамика суммарного уровня продукции АФА (а) и АФК (б) клетками перитонеальной полости, нормализованного по весу животных после воздействия ЭМИ 900 МГц. Темная область до 14 суток соответствует периоду воздействия ЭМИ, светлая область 14–42 сутки – периоду отмены действия фактора. Данные представлены как среднее и ошибка среднего (n=5).

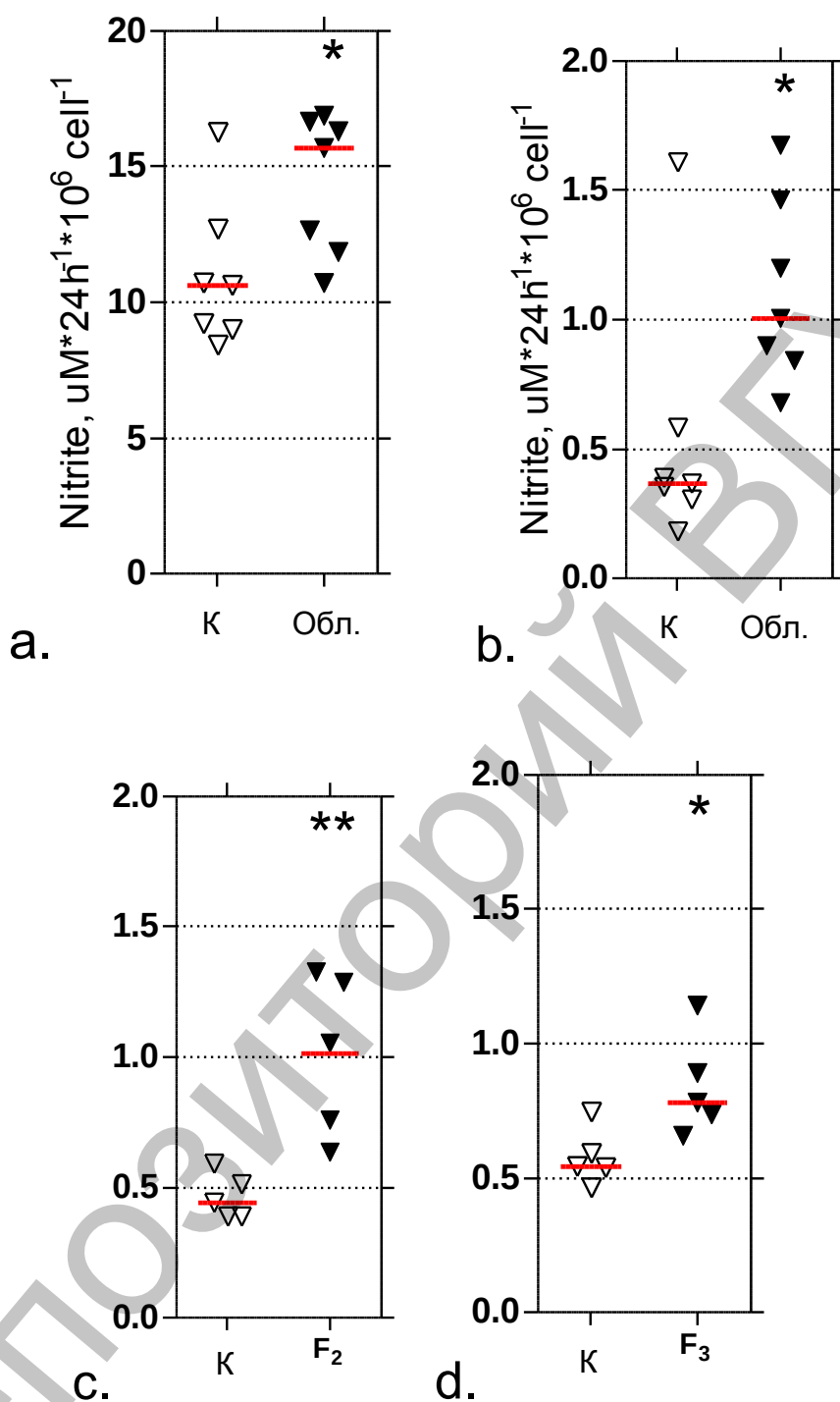


Рис. 9.6. Базальный уровень продукции активных форм азота (АФА) перитонеальными макрофагами (а) и клетками костного мозга (б) в контроле (К) и экспериментальной группе (Обл.) в отдаленные сроки (78 сутки) после облучения γ -лучами в дозе 1 Гр (~ 1 Зв) при мощности дозы 0,93 Гр/мин. Базальный уровень продукции АФА клетками костного мозга у контрольных (К) белых крыс и у животных после 4-месячного пребывания в условиях зоны ПГРЭЗ (F₂) (с) и их потомков (F₃) (d) в возрасте 7 мес. Суммарная эквивалентная доза внешнего облучения за время пребывания составила 1,45 сЗв при мощности экспозиционной дозы 5 мкЗв/час. Представлены индивидуальные значения показателя, горизонтальная черта соответствует медиане * $p < 0,05$ Mann–Whitney (U-test).

Контрольные вопросы

1. Опишите типы радиобиологических эффектов.
2. Опишите механизмы развития радиационных эффектов.
3. Какие основные стадии выделяют в действии ионизирующих излучений на биологические системы?
4. Какие известны феномены опосредованных и непрямых радиационных эффектов?
5. Какова роль процессов перекисного окисления в развитии опосредованных радиобиологических эффектов?
6. Какие методические подходы используются при исследовании окислительного метаболизма фагоцитов?
7. Как исследуют уровень продукции активных форм кислорода (АФК) в свежевыделенных резидентных перитонеальных макрофагах?
8. Как оценивают уровень продукции активных форм азота (АФА)?
9. Назовите области применения методов оценки состояния окислительного метаболизма тканевых макрофагов.

Литература

1. Small, W. Radiation toxicity: a practical guide. Introduction / W. Small, G. Woloschak // Cancer Treat Res. – 2006. – Vol. 128. – P. 3–5.
2. Ярмоненко, С.П. Радиобиология человека и животных: учебное пособие / С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон; под ред. С.П. Ярмоненко. – М.: Высш. шк., 2004. – 549 с.
3. Hildebrandt, G. Non-cancer diseases and non-targeted effects / G. Hildebrandt // Mutat Res. – 2010. – Vol. 687(1–2). – P. 73–77.
4. Coates, P.J. Indirect macrophage responses to ionizing radiation: implications for genotype-dependent bystander signaling / P.J. Coates [et. al.] // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68(2). – P. 450–456.
5. Мазурик, В.К. Роль регуляторных сетей ответа клеток на повреждения в формировании радиационных эффектов / В.К. Мазурик // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. – Т. 45(1). – С. 26–45.
6. Coates, P.J. Ongoing activation of p53 pathway responses is a long-term consequence of radiation exposure in vivo and associates with altered macrophage activities / P.J. Coates [et. al.] // J. Pathol. – 2008. – Vol. 214(5). – P. 610–616.

Г Л А В А 10. РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК АНДРОГЕН-СПЕЦИФИЧНЫХ БЕЛКОВ И ИХ ВКЛАД В НАРУШЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Среди проблем современной биохимии следует выделить расшифровку молекулярных механизмов и характера повреждающих воздействий «относительно малых» ($1 \div 100$ сГр) доз ионизирующих излучений (ИИ) и разработку адекватных методов коррекции и защиты. Актуальность решений этих проблем обусловлена не только насущными требованиями преодоления негативных для пострадавшего населения последствий аварии на Чернобыльской АЭС в зоне радионуклидного загрязнения (ЗРЗ), но и перспективами необходимости обеспечения радиационной безопасности при выполнении спецзаданий, например, во время космических полетов.

Влияние ИИ полипотентно и проявляется в организме на разных уровнях. В 1986 году под руководством академика Е.Ф. Конопки начаты работы, показавшие радиационную уязвимость эндокринной системы теплокровных и, в частности, нарушения проводимости сигнальных путей стероидных гормонов: андрогенов (А), глюко- и минералокортикоидов, прогестинов. В данной главе рассмотрены механизмы ИИ-эффектов в отношении андрогенной регуляции, обеспечиваемой специализированными транспортными и рецепторными белками, такими, как тестостерон-связывающий глобулин крови (ТеСГ) и внутриклеточный рецептор андрогенов (РА). Этот выбор обусловлен важной ролью, которую андрогены играют в процессах роста, обмена веществ, половой дифференцировки и репродукции.

1. Общие сведения

Андрогены (А) – специальный термин (от слов «*ανδροζ*» – мужской и «*γεννῆζ*» – образовывать) для обозначения класса стероидных гормонов-анаболиков, ответственных за развитие половых признаков. Их недостаток приводит к нарушениям азотистого и фосфорного обменов, атрофии скелетной мускулатуры и др. расстройствам. У млекопитающих основными А являются 5- α -дигидротестостерон (ДГТ) и тестостерон (Т) (рис. 10.1).

Тестостерон, синтезируемый клетками Лейдига в семенниках (тестисах), составляет до 95% от всей продукции А (часть образуется в сетчатом слое коры надпочечников). Концентрация Т в крови *spermatic vein* около 45×10^{-5} г/л, что примерно в 75 раз выше средней (60×10^{-7} г/л). Уровни

ДГТ в крови мужчин на порядок меньше, чем Т (56×10^{-8} г/л). А в крови у самцов млекопитающих (до 32 нмоль/л) на порядок выше, чем у самок.

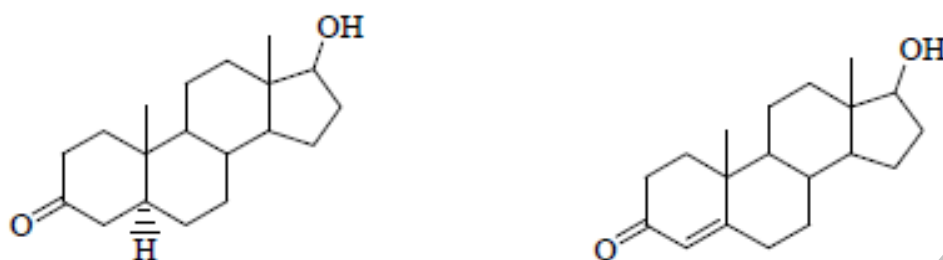


Рис. 10.1. Структурные формулы ДГТ (290 Да) – слева и Т (288 Да) – справа.

Функции А – анаболические действия на белковый обмен (задержка азота и кальция, рост тканей у молодых животных, увеличение массы тела, суммарной массы поперечнополосатой мускулатуры и ее силы). Это обеспечивается повышением синтеза ядерных ДНК и РНК в тканях, ускорением транслокации ядерной РНК в цитоплазму и стимулированием синтеза рибосомальных белков. А наряду с другими ростовыми гормонами потенцируют синтез фосфолипидов для мембран и, в частности, плазматических мембран и эндоплазматического ретикулума – активация синтеза белков и репликации ДНК увеличивает число митозов клеток.

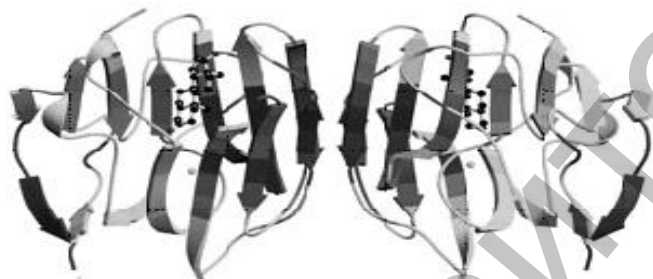


Рис. 10.2. Структура димера ТеСГ человека с массой (M_r) = 92-94 кДа.

Неотъемлемыми в опосредовании биологического действия А являются специализированные А-связывающие белки: ТеСГ (рис. 10.2) и РА (рис. 10.3).

Функции ТеСГ включают транспорт А, контроль стероидного обмена и их клиренса; также активная конформация ТеСГ (А-ТеСГ₂-комплекс) действует как пептидный гормон-активатор аденилатциклазы (АЦ) и «эстафетный трансмиттер» Т на мембранную форму РА (ПМРА), связанную с АЦ. Гидропероксидные эффекты предполагают у ТеСГ резервную роль щелочной тирозиновой фосфатазы, т.к. известно, что H_2O_2 (10^{-8} – 10^{-4} М) является в тканях «вторичным мессенджером», активирующим именно тирозиновые фосфатазы. ПААГ ЭФ сывороток крови при неденатурирующих условиях выявляет наличие ТеСГ в формах с массами у крысы – 212 кДа (олигомер r ТеСГ), 106 кДа (димер r ТеСГ); у человека – 188 кДа (олигомер h ТеСГ), 92,5–94 кДа в зависимости от степени сиаирования (димер h ТеСГ). Аминокислотные последовательности r ТеСГ (базовая

– 403) и h TeСГ (базовая – 383) сходны на 68%, также и их функции, но содержание ТеСГ в крови крыс во много раз ниже, чем у человека. ТеСГ синтезируется гепатоцитами печени, клетками Сертоли семенников и железистого эпителия простаты (предстательной железы, ПЖ). При анализе параметров ТеСГ используется меченый тритием ^3H -ДГТ, т.к. он обладает в 4–8 раз большим сродством к лиганд-связывающему центру в сравнении с ^3H -Т.

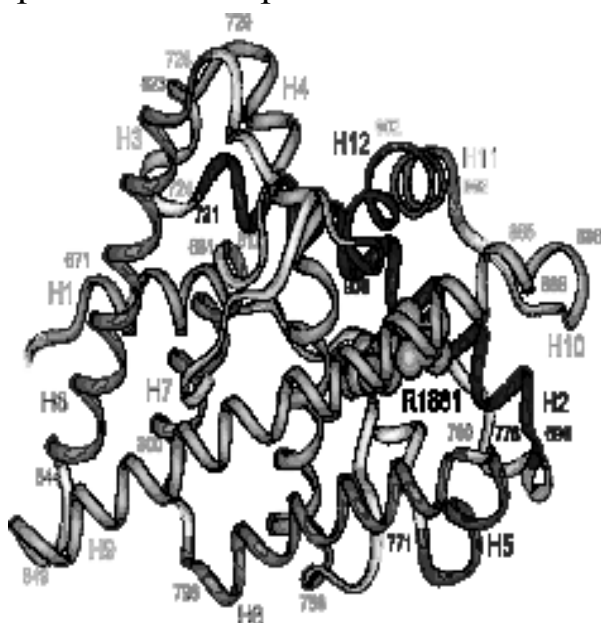


Рис. 10.3. Структура комплекса мономера РА с МТ (R1881) построена из 919 остатков аминокислот с массой (M_r) = 110 кДа.

РА работают практически в клетках всех органов, в т.ч. во всех типах популяций клеток семенников: Сертоли, Лейдига, половые, миоидные, эпителиальные, причем в А-зависимых тканях (например, ПЖ) их концентрация выше, чем в А-чувствительных (например, печень).

Для анализов РА также используют тритиированные А, например, ^3H -ДГТ или, предпочтительнее, ^3H -метилтриенолон (^3H -МТ, ^3H -R1881), т.к. он не метаболизируется (как следствие, меченый им АРК более устойчив) и не связывается с ТеСГ, что позволяет дифференцированно измерять РА даже при наличии примесей ТеСГ; одновременно

связывание ^3H -МТ с рецептором прогестинов (РП) экранируют избытком триамцинолон-ацетонида (ТА). Оценка наличия РА в семенниках, ПЖ и печени может быть проведена методом гelfильтрации цитозолей и дает тождественные результаты. После калибровки хроматографической колонки белками-стандартами определяются массы РА пиков **I** и **II**: 110–240 кДа и 50–80 кДа – «разбежка» связана с наличием разных форм РА (базовые r РА крысы и h РА человека построены из 902 и 919 остатков аминокислот; к ним могут присоединяться факторы регуляции). Ди- и мономеры РА показывают одинаковые величины сродства ($K_a = 1/K_d$) к А (рис. 10.7).

Функция РА – проведение (осуществление) андрогенного сигнала. По сути, РА «ходит как челнок» между плазматической мембраной (ПМ) и ядром клетки: за андроген-рецепторным связыванием *in vivo* следуют трансформация, активация РА с образованием димерного А-рецепторного комплекса (АРК₂) и транслокация его в ядро ($t_{0,5T_{max}}=1; 3; 10$ мин), где он «садится» («Zn²⁺-пальцами» АРК₂) на промоторы генов в хроматине; при этом АРК конформационно перестраивается ($10S \rightleftharpoons 5S \rightleftharpoons 7S$), изменяя массу

и радиус Стокса (406, 110, 237 кДа; 89, 51, 74 Å); весь процесс энергозависим (88 кДж/моль, требует фосфорилирования + дефосфорилирования) и до высвобождения уже мономерного неактивного РА из ядерного хроматина по окончании полного **рецепторного цикла** (появления РА в цитозоле после выхода из ядра клетки) занимает 70 мин.

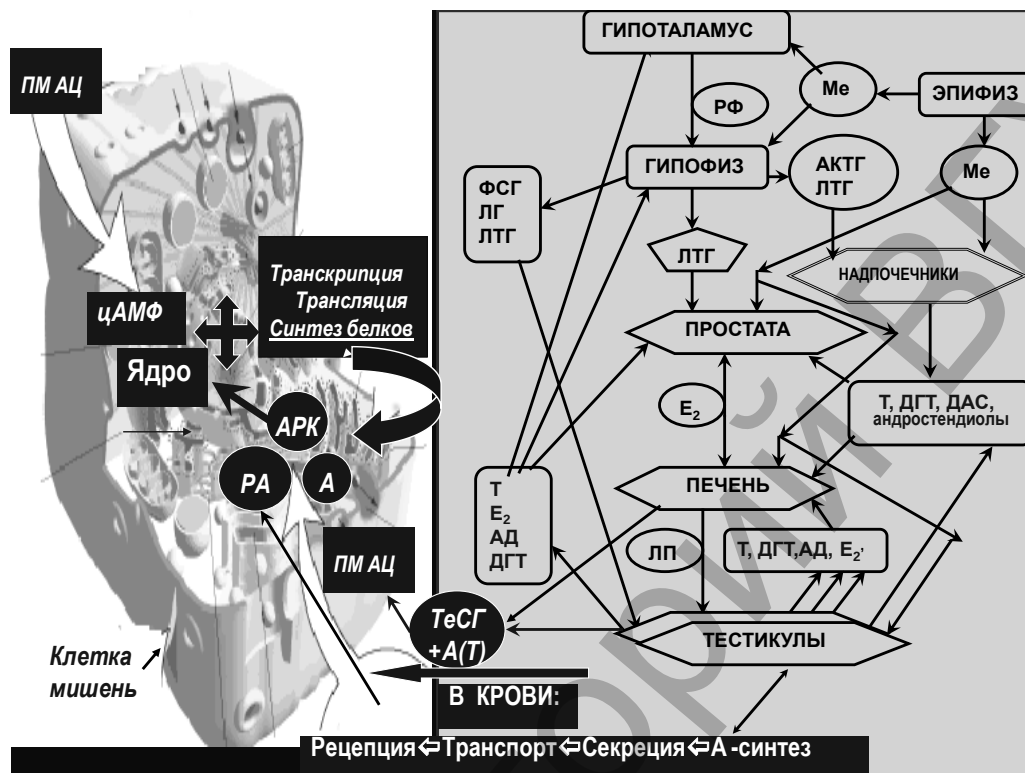


Рис. 10.4. Общая схема андрогенной регуляции.

АРК₂ «стимулируют» в ядре РНК-полимеразу **II**, α-ДНК-полимеразу, участвуют (совместно с ко-активаторами) в запуске синтеза (через процессы трансляции с «наработкой» мРНК) соответственно: эпидермального фактора роста, белков рибосом, цитохром-с-оксидазы, ацетилхолинэстеразы, тимидинкиназы, α-2_u-глобулина, протеинкиназы «**СК1**», и др., а также ферментов цикла Кребса, гликолиза, пентозофосфатного цикла (рис. 10.4). В ядрах клеток ПЖ, например, на АРК «откликаются» 35 генов, причем частота транскрипций увеличивается у 25, а у 10 снижается.

2. Влияние ИИ на уровни Т- и А-связывающих параметров ТеСГ

Отношения уровней **концентраций** [Т] и [ТеСГ] в крови отражают андрогенный статус организма, позволяя судить о биодоступности А. В этой связи проведена оценка [Т] и параметров белка _гТеСГ в динамике после воздействий ИИ. Выявлено, что радиационные нагрузки от острого

внешнего облучения потенцируют секрецию Т (рис. 10.5), с увеличением его концентраций в крови на 83%, 115% и 269% к 1–3 сут после воздействия 25, 50 и 100 сГр, но транзиторно. Низкоинтенсивное пролонгированное ИИ (50, 100 сГр) «отзывается» менее резкими подъемами уровней Т (меньшая амплитуда, «растянутость эффектов по глубине и длительности»).

Эффекты облучения, «накладываясь» на суточно-сезонные ритмы, проявляются «волнами» с первичным (1–30 сут) дозозависимым увеличением (в 1,3–3,7 раза) концентрации Т. Введение ^{131}I (2,5 МБк/кг) на 1–3 сут «стимулирует» рост [Т] в 2,5 и 1,8 раза с «депрессией» к 10→365 сут.

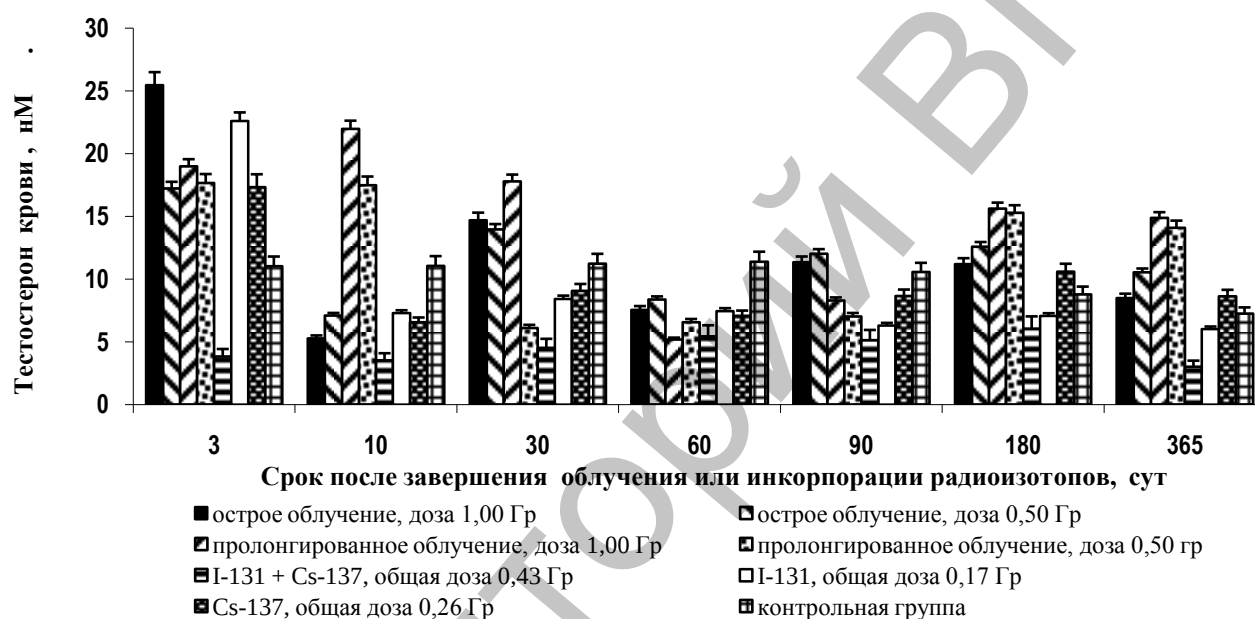


Рис. 10.5. Постлучевая динамика изменений концентрации Т в крови у самцов.
Примечание: возраст крыс в начале опыта – 90 сут, различия достоверны ($p < 0,05$).

Раздельная и сочетанная инкорпорации ^{131}I и ^{137}Cs за 10 сут (дозы на все тело $\leq 0,15$ Гр) приводят к персистирующему снижению (на 24–48%) уровней Т в крови, усугубляясь действием радиотоксинов и химиотоксичности ^{131}I и ^{137}Cs . В отдельные сроки поглощение А тканями тормозится. Судя и по параметрам ТеСГ, «реагирующим» на ИИ, – например, «рост» у ТеСГ сродства (K_a) и его олигомеризация ($\eta_{\text{нш}} > 2,3$) в связывании А-лиганда способствуют задержке А в крови (табл. 10.1, рис. 10.5).

Механизм транзиторного подъема [Т] в крови опосредуется двояко – локально, через изменения микровязкости мембран везикул с Т в клетках Лейдига и регуляторно гипоталамо-гипофизарными факторами.

При исследовании эффектов ИИ гормон-связывающие характеристики ТеСГ также информативны (табл. 10.1). Лучевые воздействия

(25–100 сГр) приводят к снижению [ТеСГ] в крови, причем более выраженному у неполовозрелых самцов крыс (в возрасте до 7 нед.) и данные эффекты прослеживаются длительно (рис. 10.6), причем в оценке эффектов ИИ кооперативность ТеСГ ($\eta_{\text{нш}}$) во взаимодействии с А-лигандом проявила себя как наиболее чувствительная характеристика. С учетом того, что из легочных альвеол идет оксигенация (превращение венозной крови в артериальную), судя по «маркеру кооперативности», именно легкие являются тем органом, где происходит активация ТеСГ, т.е. его конформационная модификация в димерную молекулу ($\eta_{\text{нш}} \rightarrow 2$), узнаваемую на ПМ специфическими рецепторами аденилат-циклазы клеток.

Таблица 10.1 – Динамика параметров Т и ТеСГ крови* после γ -облучения самцов крыс порционно $5 \times 0,2$ Гр/сут с мощностью $83,33 \times 10^{-5}$ Гр/с ($M \pm m$)

Параметры крови	Сроки наблюдения (время после окончания облучения, $\Sigma D = 1$ Гр)					
	30 сут		90 сут		180 сут	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
А						
[Т], нМ	10,5±1,5	18,3±2,8*	10,5±2,9	24,0±3,8*	9,6±3,1	7,1±1,6
гТеСГ						
$\eta_{\text{нш}}$	1,1±0,1	2,5±0,3*	1,1±0,1	2,0±0,1*	1,1±0,1	2,1±0,3*
$K_a \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	1,6±0,2	2,3±0,1*	0,9±0,3	2,5±0,3*	1,5±0,2	2,2±0,2*
B_{max} , нМ [#]	1,0±0,1	0,5±0,1*	2,0±0,1	0,9±0,1*	2,4±0,2	1,4±0,2*
N_a , фмоль на мг белка [#]	13,2±1,1	6,2±0,5*	26,3±1,8	11,4±0,7*	32,2±2,5	38,8±2,8

Примечание: *здесь и далее – анализ при 30-кратном разведении сыворотки;

[#] здесь и далее – концентрация молекул А-связывающего белка (в расчете на неразведенную кровь); возраст крыс к началу эксперимента = 21 сут;

*различия достоверны ($p < 0,05$).

Первичная реакция на облучение в дозах 25–100 сГр отличается тем, что гТеСГ олигомеризуется (кооперативность связывания А-гормона увеличивается: $\eta_{\text{нш}}$ 1,1→2,5 ед). У человека реакция $\eta_{\text{нш}}$ гТеСГ-параметра на действие ИИ может отличаться, что обусловлено видовыми особенностями и разными условиями, при которых получены лучевые нагрузки.

В организме существует «эстафета» передачи андрогенов с ТеСГ на внутриклеточные РА, и при снижении [ТеСГ] в крови облученного организма уменьшается доля ТеСГ-связанного гормона, что расценивается как «выход Т из-под контроля» в виду «разрыва эстафеты». В этом случае возрастает доля свободной фракции Т. Падение уровней ТеСГ ведет и к сокращению регуляторных сигналов на ПМ-рецепторы АЦ к комплексу ТеСГ

с гормоном, дополнительно нарушая эндокринный контроль. Рост $[T]$, а именно несвязанного белками крови гормона, способствует свободной диффузии А в клетки, повреждая ПМ и провоцируя малигнизацию из-за ослабления контактного торможения. ИИ-повреждения усугубляются хаотропными эффектами ИИ в отношении ПМ клеток.

Развивающаяся в восстановительный период реакция образования $rTeSG$ -димеров ($\eta_{III} \rightarrow 2$, см. рис. 10.6) – компенсаторная реакция для усиления работы $rTeSG_2$ -рецепторов аденилат-циклазы ПМ при радиационном стрессе, т.к. колебания $[T]$ и сопутствующие им сбои дестабилизируют гомеостаз, снижая жизнеспособность организма.

Наибольшую ценность представляют данные, полученные при обследовании человека.

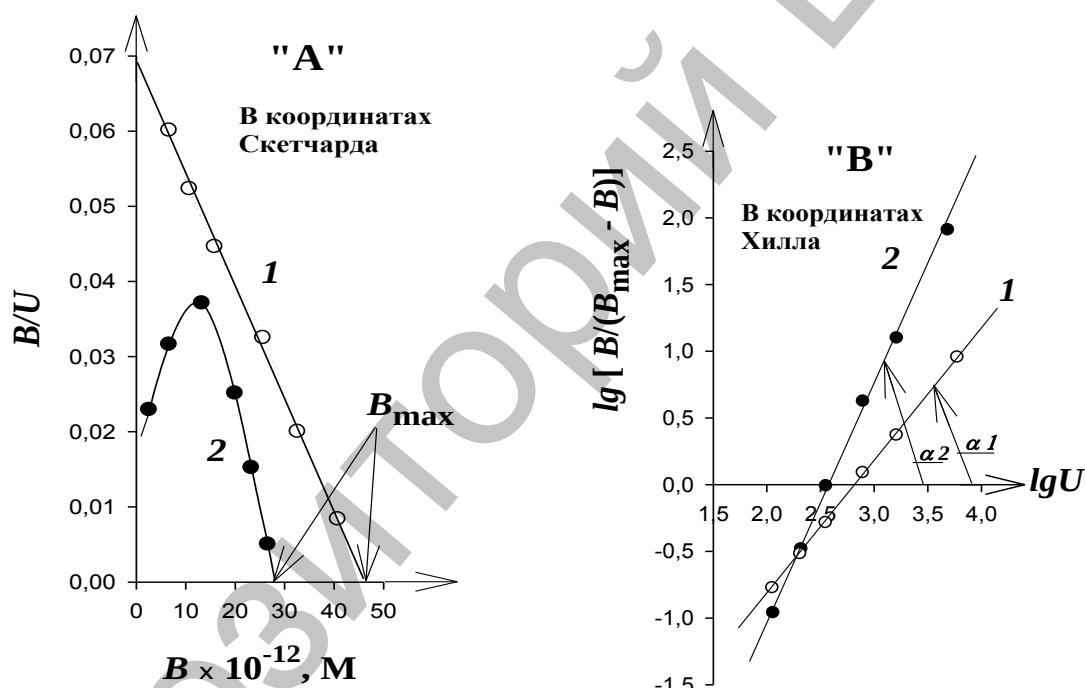


Рис. 10.6. Изменения характера $^3A + TeSG$ -взаимодействия у крыс в 4-мес. возрасте через 90 сут в восстановительный период после γ -облучения ($0,5 \text{ Гр}$; $35,07 \times 10^{-8} \text{ Гр/с}$).

1 – контроль; 2 – опыт; $\alpha 1$, $\alpha 2$ – углы наклона ($\eta_{III} = \text{tg } \alpha$).

Максимально высокие концентрации $TeSG$ отмечены у детей возраста 3–6 лет. В возрастной период до 6 лет, как у мальчиков, так и у девочек, констатируется одинаковое, но в то же время самое низкое содержание T в крови. С 14–15 лет уровни $[TeSG]$ снижаются в 3–5 раз, причем на фоне увеличения $[T]$, а со вступлением в фазу пубертата к 13–15 годам уровни $[T]$ возрастают у юношей в 4–5 раз и у девушек – в 2–3 раза. Наиболее стабилен в отношении концентраций T и $TeSG$ возрастной период с 7

до 12 лет, причем характеристики ТеСГ совпадают у обоих полов. Известно, с 12 лет завершается становление половой системы человека, а затем наступает половая зрелость. Поэтому для анализов использованы сопоставимые образцы сыворотки крови пациентов возраста (7–12 лет). По мере разведения сыворотки значения N_a и B_{max} «увеличиваются», а K_a и η_{III} – снижаются, т.о., конформация ТеСГ в образцах «искажается» в т.ч. из-за «диссоциаций» молекул регуляторных факторов.

Таблица 10.2 – Характеристики ТеСГ сыворотки крови (разведение 1:25) у здоровых и подвергшихся ИИ-воздействиям детей 7–12 лет ($M \pm m$)

Параметры ТеСГ	Группы обследованных пациентов				
	D1	D2	D3	D4	D5
η_{III}	1,9±0,1	1,5±0,2*	1,3±0,2*	1,2±0,1*	1,1±0,1*
$K_a \times 10^9 M^{-1}$	6,8±0,4	2,0±0,5*	2,1±0,5*	1,4±0,2*	1,2±0,2*
B_{max} , нМ [#]	68,1±8,3	32,2±7,5*	23,1±4,8*	29,3±3,5*	26,4±2,9*
N_a , фмоль на мг белка [#]	945,7±131,4	454,4±105,8*	339,0±84,1*	423,6±50,7*	399,3±73,1*

Примечание: из данных о высокодостоверной (коэффициент корреляции $r = -0,84$) обратно пропорциональной зависимости между уровнями загрязнения местности проживания по радиоцезию и величинами η_{III} следует, что наиболее радиочувствительным маркером дозы облучения у ребенка является степень потери кооперативных свойств ТеСГ в отношении связывания А-лиганда.

D1 – контрольная группа (Браславский, Минский и Столбцовский р-ны); **D2** и **D3** – дети из Могилевской обл., загрязнение по $^{137}\text{Cs} \leq 185 \text{ кБк/м}^2$ ($\leq 5 \text{ Ки/км}^2$) и $185\text{--}370 \text{ кБк/м}^2$ ($5\text{--}10 \text{ Ки/км}^2$); **D4** – группа с патологией ЩЖ, дозы 0,3–0,7 Гр (Наровлянский и Комаринский р-ны, загрязнение по ^{137}Cs до 556 кБк/м^2 [$\leq 15 \text{ Ки/км}^2$]); **D5** – группа с патологией ЩЖ, дозы 1,0–2,2 Гр (Брагинский и Хойникский р-ны, загрязнение по ^{137}Cs до 556 кБк/м^2 [$\leq 15 \text{ Ки/км}^2$]);

[#] в пересчете на исходную сыворотку;

*различия достоверны ($p < 0,05$).

Результаты исследования параметров (молекулярных характеристик) ТеСГ пациентов из «радиационно-чистых» районов и ЗРЗ приведены и сопоставлены в табл. 10.2. Согласно клиническим анамнезам, районы проживания загрязнены по ^{137}Cs от 148 до 556 кБк/м^2 ($4\text{--}15 \text{ Ки/км}^2$). Дозы от «радиойодного удара» на ЩЖ при этом варьировали от 0,3 до 2,2 Гр, и у большинства пациентов были выявлены аутоиммунный тиреоидит, гиперплазия и/или ЭУЩЖ I-й и II-й степени. Измерения показали в образцах сыворотки крови здоровых детей обоего пола из Минского, Браславского и Столбцовского р-нов между молекулами ТеСГ позитивное кооперативное взаимодействие в связывании А ($\eta_{III} \approx 2 \text{ ед.}$; 8.00 утра).

После аварии на ЧАЭС в зависимости от дозы облучения ЩЖ от ^{131}I и загрязнения местности ЗРЗ по ^{137}Cs параметры ТеСГ проявили отклонения и нарушения, а именно: содержание $_{\text{н}}\text{ТеСГ}$ в крови уменьшалось в 2,1–3,0 раза, сродство к А «падало» в 3,3–5,7 раза, кооперативность связывания А у $_{\text{н}}\text{ТеСГ}$ уменьшалась в 1,2–1,6 раза, что резко усиливало приток А в клетки тканей (выход А из-под ТеСГ-контроля). Однако, избыток А в гипоталамусе блокирует продукцию люлиберина, а в гипофизе тормозит синтез мРНК α - и β - субъединиц ТТГ, затрудняя тиреоидную регуляцию, что раскрывает механизмы ИИ-индуцирования гипогонадизма и гипотиреоидизма у облученных детей – причины задержки их возрастного, полового и умственного развития.

3. Влияние ИИ на цитоторецепцию в семенниках, простате и печени

Хроматографический анализ ^3H -А-меченых РА дает тождественные результаты для разных по гормонокомпетентности (соматических, генеративных) тканей. Анализ связывания ^3H -А с РА в координатах Скэтчарда и Хилла показывает в «нативном» цитозоле А-рецепцию с позитивной кооперативностью (η_{Hill} 1,9–2,4) при низкой (4 °C) и физиологической (37°C) температурах, что характерно для РА-димеров. Разведение цитозоля (и эффекты ИИ) ведет к диссоциации димеров в мономеры РА и «потере» ими позитивной кооперативности – $\eta_{\text{Hill}} \downarrow$ до 0,96–1,03 (см. рис. 10.7).

Исследованная зависимость кооперативных свойств РА от степени разведения цитозольных систем указывает на то, что активная конформация АРК поддерживается не только стероидом, но возможно, и каким-то внеклеточным фактором (факторами) регуляции. Проверка этого предположения показала, что РА-димер не восстанавливался добавлениями к цитозолю, содержащему мономеризованный РА, микроколичеств концентрированного интактного цитозоля и концентрированного цитозоля с липидными фракциями.

Проведенные исследования показали возможность восстановления димерной конформации тестикулярного РА (табл. 10.3), что повышает его кооперативную, следовательно и физиологическую активность (η_{Hill} 1,0→2,2).

В ходе экспериментов установлено: сыворотка старых 28-мес. самцов не обладает способностью восстанавливать димерную форму РА. Димеризационный эффект отсутствует и при использовании крови, отобранной не в ранние утренние часы, а позднее (табл. 10.3). После предобработки «утренней» сыворотки 6-мес. крыс 2,5%-ной суспензией активированного угля (15 ч 4 °C), она сохраняет способность вызывать эффект димеризации РА. Значительно более высокое

(чем в цитозоле) содержание в сыворотке несорбируемого декстран-покрытым углем «фактора димеризации» указывает на то, что кооперативные свойства (активность) РА регулируются поступающим из крови нестероидным модулятором конформации (**МКА**), проходящим и гемато-тестикулярный барьер. Исходя из данных об АРК (димер РА – 237 кДа, мономер РА – 110 кДа), молекулярная масса **МКА** = $[237\text{ кДа} - (2 \times 110\text{ кДа})] = 17\text{ кДа}$.

Таблица 10.3 – Влияние микроколичеств (1/20) различных образцов сыворотки крови на характеристики РА крыс 6-мес. возраста ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Характеристики ^3H -МТ-РА взаимодействия			
	В семенниках		В печени	
	$K_a \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$\eta_{\text{нш}}$	$K_a \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$\eta_{\text{нш}}$
Контроль «К1» – исходный «нативный» цитозоль	5,2±1,1	2,1±0,1	5,6±0,4	2,3±0,1
Контроль «К2» – исходный цитозоль разведен в 10 раз	4,1±0,9	1,0±0,1*	4,4±1,2	1,0±0,1*
Контроль «К3-1» – исходный цитозоль спустя 30 сут после острого γ -облучения (20 сГр)	7,9±0,4*	1,5±0,2*	8,1±0,1*	1,4±0,1*
Контроль «К3-2» – исходный цитозоль спустя 30 сут после маломощного γ -ИИ (0,25 Гр)	5,5±0,6	1,6±0,2*	7,8±1,6	1,5±0,1*
Контроль «К2» + и.с. (8.30) [#]	5,4±1,4	2,2±0,1*	5,0±1,1	2,2±0,1*
Контроль «К2» + у.с. (8.30)	5,7±1,1	2,2±0,1*	5,5±1,6	2,2±0,1*
Контроль «К2» + и.с. (10.30)	4,6±0,7	1,1±0,1	4,6±1,4	1,1±0,1
Контроль «К2» + и.с. (14.30)	4,8±1,0	1,1±0,1	4,1±0,10	1,0±0,1
Контроль «К2» + сыворотка от 28-мес. крыс (8.30)	5,1±1,0	1,0±0,1	4,7±1,9	1,0±0,1
Контроль «К2» + сыворотка от 6 мес. крыс (8.30) после их острого γ -облучения (20 сГр)	5,3±0,8	1,0±0,1	4,4±1,1	1,0±0,1
Контроль «К3-1» + у.с.	6,6±1,1	2,2±0,1*	6,1±1,7*	2,0±0,2*
Контроль «К3-2» + у.с.	5,4±0,9	2,2±0,1*	5,8±1,5	2,0±0,1*

Примечание: [#] время отбора крови (8.30; 10.30; 14.30); и.с. – интактная сыворотка крови от контрольных 6-мес. крыс; у.с. – углем-обработанная сыворотка от контрольных 6-мес. крыс (после 15 ч предобработки активированным углем при 0–4 °С);

* различия статистически достоверны при $p < 0,05$ ($n = 6$).

Роль **МКА**-фактора сыворотки крови, видимо, заключается в содействии реактивации поступающих из ядра клетки мономеров АРК путем фикс-

сации стабилизированной стероидом активной конформации рецептора, т.е. **МКА** участвует в запуске каждого нового цикла челночного механизма «РА-аппарата» клетки в «нужное» организму время. Из полученных данных ($\uparrow K_a$, $\uparrow \eta_{\text{III}}$) следует, что мономер РА реактивируется ($2 \times 4,5S \rightarrow 8S$) внесением в систему инкубации аликвот сыворотки крови необлученных животных. Это подразумевает опосредованно-дисрегуляторный механизм нарушения свойств РА. Принципиальное значение данных результатов в том, что была доказана обратимость радиационно-индуцированной мономеризации РА.

Далее исследования показали, что ИИ «отражаются» на параметрах РА-систем репродуктивных (семенники, простата) и соматических (печень) тканей на протяжении всего времени наблюдений ($\sim 1/3$ продолжительности жизни крыс). Печень и семенники на острое облучение реагируют сходно: дозы 10–25 сГр к 3 сут снижают $N_a([РА])$, а дозы 50–100 сГр – увеличивают (накопление мономеров РА), с разницей в амплитуде реакции. Исключение обнаруживается у неполовозрелых животных, – параметр N_a изменяется в семенниках и печени разнонаправлено. При 5,0 Гр «падение» величин N_a сопряжено с терминацией синтеза белков, в т.ч. из-за прекращения анаболических стимуляций через РА (вклад в синдром радиационного старения). Эффекты ИИ проявляются также исчезновением позитивной кооперативности РА, причем в зависимости от дозы и сроков: большее снижение η_{III} (в 1,5–2,1 раза) установлено при 0,5–1,0 Гр; а при 0,1–0,25 Гр η_{III} снижаются в 1,3 раза. После низкоинтенсивного облучения (10–50 сГр) следует $[\downarrow РА]$ в тканях (1→30 сут), однако при 1,0 Гр – «рост» N_a на 3→30 сутки. Динамики параметров [РА] после экспонирования источникам ИИ, в т.ч. при сочетании факторов (0,1–1,0 Гр + ^{131}I + ^{137}Cs) «нелинейны» (рис. 8–10): инкорпорация сопровождается длительной рецессией N_a , отчасти «компенсируется» в отдаленные сроки (≥ 180 сут).

В ходе исследований в ИРБ установлено, что воздействия ИИ индуцируют в цитозоле клеток накопление мономеров РА ($\downarrow \eta_{\text{III}}$) с «утраченной» ими способностью к трансформации, активации и транслокации в ядро клетки. Феномен развивается по двум механизмам: во-первых, за счет выхода из ядра в цитозоль клеток новых порций РА-белков после окончания их А-рецепторных циклов (без возобновления); во-вторых, за счет попадания в цитоплазму РА из ПМРА после «постлучевого разжижения» квазикристаллической структуры ПМ. Локальные нарушения регуляторных взаимосвязей в итоге снижают число проведенных в ядро А-сигналов и «некоторая часть» андроген-чувствительных генов «замолкает».

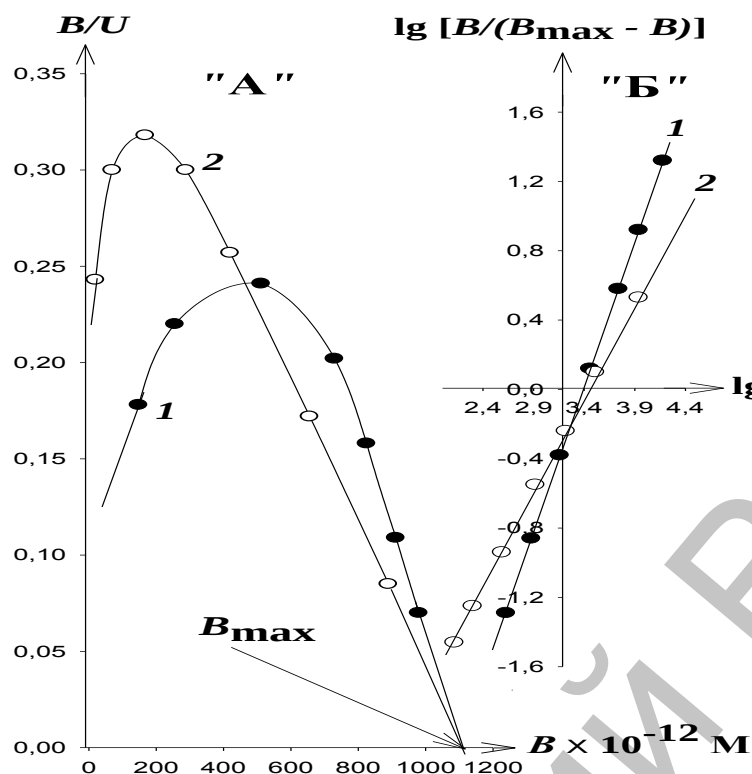


Рис. 10.7. Пролонгированный эффект γ -ИИ ($0,5 \text{ Гр}$; $5,83 \times 10^{-7} \text{ Гр/с}$) на ^3A -гормональное связывание циторецептором андрогенов.

1 – димер РА (контроль); 2 – мономер РА (60 сут спустя ИИ у 5-мес. крыс).

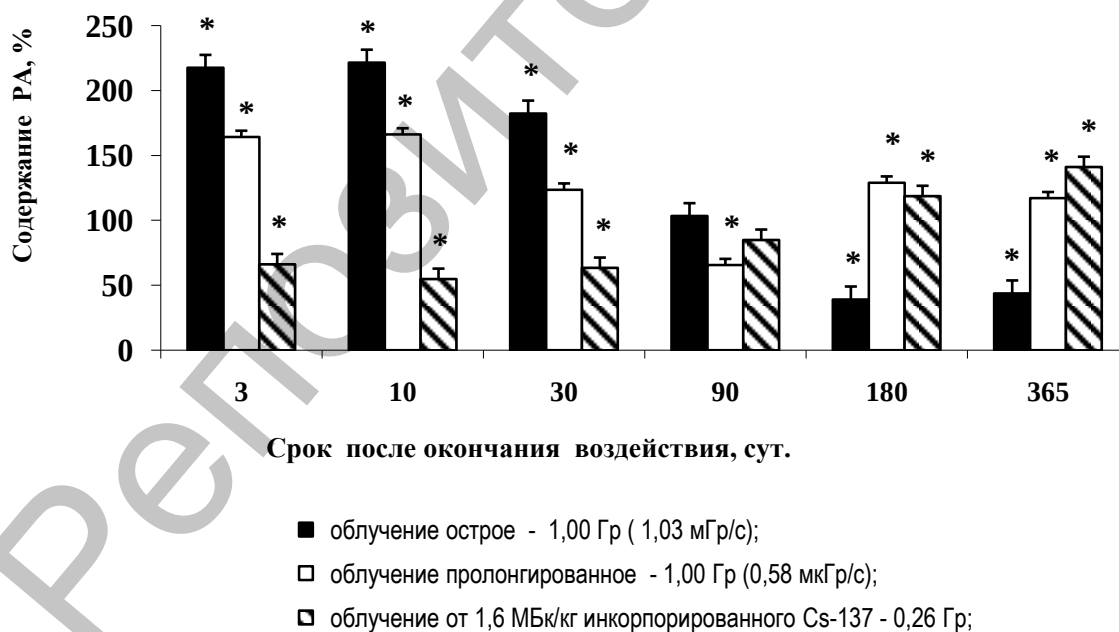


Рис. 10.8. Динамика изменений [РА] в семенниках под воздействием ИИ.
Примечание: * различия достоверны ($p < 0,05$) относительно контроля (100%).

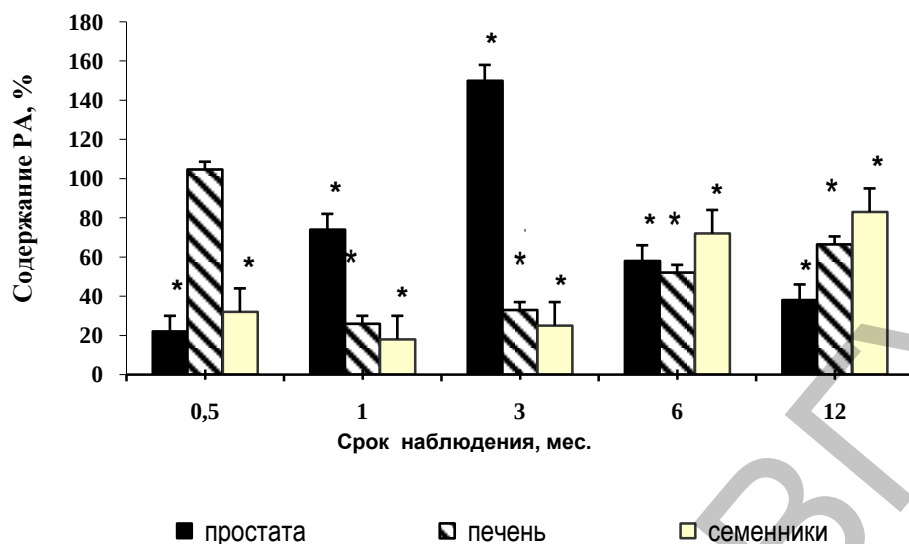


Рис. 10.9. Содержание сайтов РА в половых (ПЖ, семенники) и соматических (печень) тканях после сочетанного введения $^{131}\text{I}/^{137}\text{Cs}$ (2,5/1,6 МБк/кг).

Примечание: * различия достоверны ($p < 0,05$) относительно контроля (100%).

С учетом анаболической и гонадорегулирующей роли А, «снижение активности» РА после ИИ-индуцированной мономеризации ($\eta_{\text{НИИ}}$ 2,2→1,1) раскрывает молекулярный механизм задержки развития плода в организме матери в период органогенеза, в т.ч. при инкорпорации радиойода (рис. 10.9).

Возникновение «андрогенового голода» – проблемы из-за дефицита андрогенной регуляции/стимуляции при ИИ-индуцированных «утратах» функциональных РА и ТеСГ – вносят свой вклад и в развитие потерь мышечной и костной массы у астронавтов при продолжительных космических полетах.

Оценка радиоэкологических влияний после возвращения крыс из реперных точек (р.т.) ЗРЗ (сроки 3→180 сут.) выявляет: во-первых, изменения [РА], во-вторых, снижение кооперативности РА: в начальные сроки (3, 10 сут) значения $\eta_{\text{НИИ}}$ «падают» с 2,0–2,3 до 1,0–1,2 и далее (30, 90 и 180 сут) «на уровне» 75%, 84%, 76% (т.е. не нормализуются); в-третьих, отклонения величин K_a , свидетельствующие о «перестройках» свойств РА при «малых» радиационных нагрузках. Так, анализ РА в ПЖ крыс (рис. 10.10) показывает аналогичный, как в семенниках после введения ^{137}Cs , рост величин N_a (мономеризация РА) пропорционально дозам (1,1→12,0 мЗв) от 100% в контроле до 261% в р.т. «Брагин»; но после «недолгого» пребывания в 800 м от 4-го энергоблока ЧАЭС (1 мес. в р.т. «Припять», 1992 г.), несмотря на большую радиационную нагрузку (~130 мЗв) параметр N_a снижается (на 21%); величины инкорпорированных $^{134,137}\text{Cs}$ коррелируют с уровнями содержания РА и с поглощенными дозами облучения, а гравиметрия обнаруживает уменьшение массы ПЖ по мере

увеличения суммарной дозы вплоть до 49% от контроля: развиваются дегенеративные процессы особенно в железисто-эпителиальном пуле клеток и гипоплазия ПЖ; противоречие между ростом N_a РА, являющихся потенцирующим фактором функции ПЖ, и дегенерацией ее клеток разрешается с утратой функциональных (димерных) РА после облучения. Увеличенная радиоэкологическая нагрузка (~360 мЗв в р.т. «Припять», 1989 г.) лишь на ~25% снижает массу ПЖ, возможно, из-за способности больших доз ИИ активнее включать репаративные процессы.

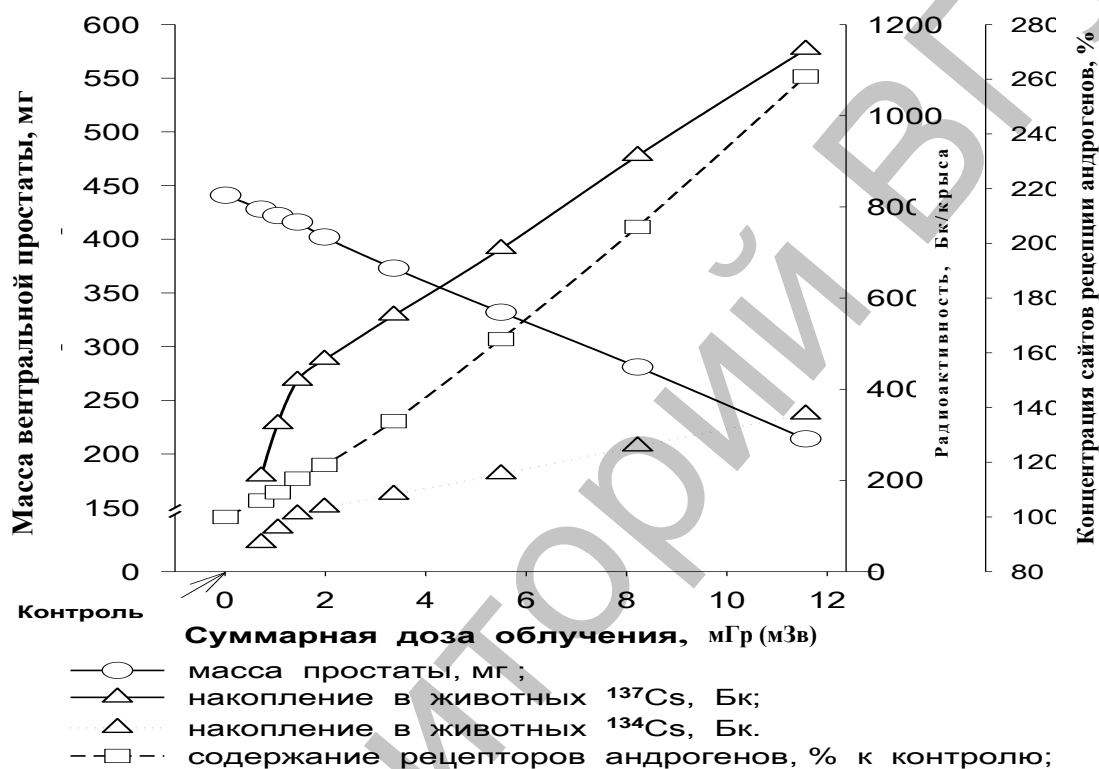


Рис. 10.10. Влияние радиоэкологических факторов на содержание РА и массу вентральной простаты после 6-мес. пребывания крыс в р.т. ЗРЗ.

В экологических исследованиях в корм животных входила с/х продукция, полученная в ЗРЗ. При этом, в частности в 1989 г., содержание нуклидов составляло (кБк/кг) в сухом молоке: ^{137}Cs – 2,16; ^{134}Cs – 0,72; в комбикорме: ^{137}Cs – 0,37; в зерне: ^{90}Sr – $4,10 \times 10^{-7}$; $^{238/240}\text{Pu}$ – $14,06 \times 10^{-12}$; ^{137}Cs – 4,86; ^{134}Cs – 1,42; радиоактивность подстилки – 62,90. Суммарная доза от внутреннего облучения – 29,3 мГр. Следовательно, эффекты ЗРЗ усугублялись и химиотоксичностью поглощенных с фуражом нуклидов, в т.ч. $^{134,137}\text{Cs}$ для почек, семенников, костного мозга и др. органов. Помимо внутреннего (от «грязного» корма) во все годы (1986–2002 гг.) в р.т. ЗРЗ оставался значительным вклад внешнего облучения γ -фона, например, в 1996 г. обусловившего накопление животными эквивалентной дозы 16,4 мЗв.

Влияние ИИ на акцепцию АРК ядрами клеток-мишеней

Следующим после циторецепции этапом в реализации А-сигнала является ядерная акцепция АРК. Анализ показывает, что в клетках ПЖ удельные величины ядерной акцепции АРК больше (~ на 80%), чем в гепатоцитах (меньшая гормоно-компетентность соматических тканей), но изменения от воздействия ИИ (10–100 сГр) в ПЖ и печени проявляются сходно (табл. 10.4). Так, к 3–30 сут ядерная акцепция АРК снижается на 20–42%, а затем к 180 сут возрастает до 126–172% от контроля. Выявляемые временные повышения величин ядерной акцепции АРК отдаленны по сроку от окончания облучения (180 сут), следовательно, не были вызваны пострадиационным увеличением проницаемости ядерных оболочек.

Таблица 10.4 – Влияние низкоэнергетического γ -ИИ на акцепцию АРК ядрами простаты и печени в зависимости от доз и сроков наблюдения ($M \pm m$) [66]

Величины ядерной акцепции ³ H-АРК, фмоль/мг ДНК							
Контроль			Опыт, дозы и сроки после окончания γ-облучения				
30 сут	180 сут	360 сут	Дозы, Гр	3 сут	30 сут	180 сут	360 сут
Простата							
163,8 ±22,7	159,5 ±12,9	79,4 ±8,5	0,1	102,4±14,4*	107,2±10,1*	184,2±9,6	86,8±9,4
			0,5	99,7±7,4*	138,4±7,8	256,8±9,5*	97,3±9,7
			1,0	93,8±5,63*	137,3±17,0	274,3±14,7*	121,3±8,9*
Печень							
32,6 ±4,2	31,3 ±2,0	12,7 ±1,8	0,1	23,1±1,4*	25,4±1,2*	38,8±3,0*	13,5±2,7
			0,5	22,1±1,8*	29,3±3,4	51,9±8,0*	20,8±1,6*
			1,0	18,5±0,8*	27,3±0,7	56,0±7,2*	19,4±0,9*

Примечание: крысы с 6-мес. возраста за 48 ч получали 0,1 Гр; за 238 ч – 0,5 Гр; за 477 ч – 1,0 Гр;

* различия достоверны относительно контроля ($p < 0,05$).

Механизм их «заключается» в дерепрессии участков рекогниции АРК в промоторах тех А-чувствительных генов, которые активируются для обеспечения репаративного синтеза. Так как большие дозы (50–100 сГр) эффективнее стимулируют «включение» этих генов, то это также является и механизмом компенсации ИИ-индуцированного затухания А-регулируемых процессов. Оценки влияния радиоэкологических факторов подтверждают закономерности, обнаруженные в лабораторных опытах на животных, – они свидетельствуют о снижении в 2,7 раза ядерной акцепции АРК сходно в соматических (печень) и половых (ПЖ) тканях, также указывая на «падение мощности работы» РА-систем в клетках облученных животных.

Наведенные радиацией «искажения» конформации мембранной «формы» РА, связанной с АЦ, ведут к разрыву регуляторных связей, что задерживает РА в нетранслоцируемой (в ядро) мономерной форме, и развивается частичная «неспособность» клеток реагировать на А-регуляцию, т.к. транскрипцию генов включают только димеры АРК [9].

Схема индуцированного нарушения работы РА-цикла дана на рис. 10.11.

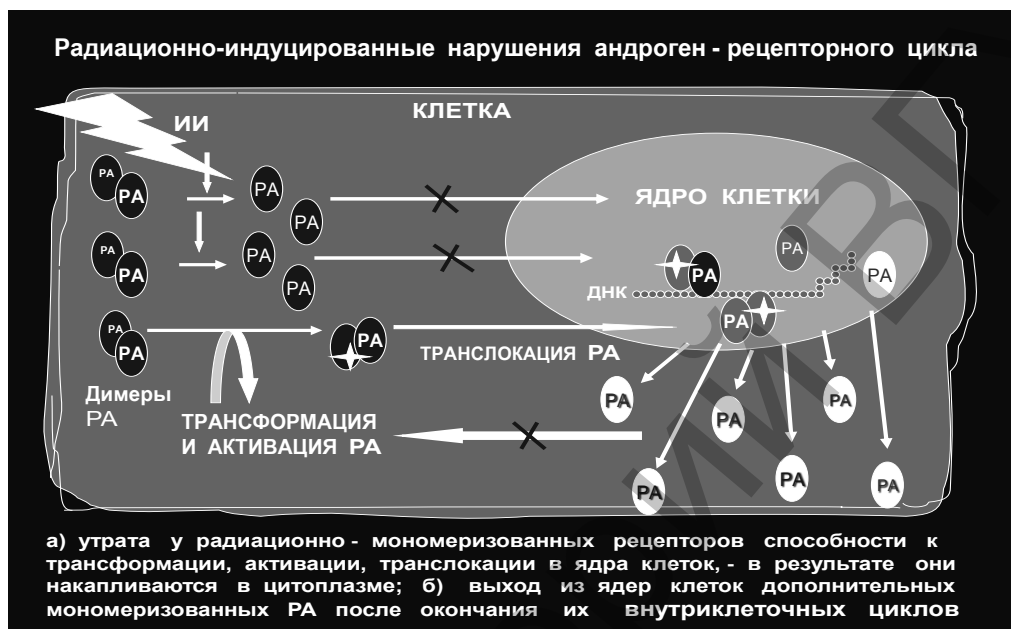


Рис. 10.11. Схема ИИ-индуцированного нарушения андроген-рецепторного цикла.

4. Характеристики РА при оценке радиопротекторных препаратов

В ходе выяснения последствий радиационных эффектов встал вопрос о поиске средств восстановления функции РА. Исходя из возможного опосредования части эффектов радиопротекторов через А-регуляцию разработан способ оценки активности проверяемых фармпрепаратов по параметрам РА. Данный подход выявил *in vivo* коррекцию нарушенных ИИ параметров РА бифидопрепаратом (**БФБ**) из культур *Lactobacter plantarum* К9 и *Bifidobacterium adolescentis* БИМ91 (табл. 10.5).

Условия опыта обеспечивали равное *per os* потребление **БФБ** животными из автопоилок (9×10^8 КОЕ/мл) в течение 1 мес. после облучения от γ -источника и/или содержания их в ЗРЗ (р.т. «Припять», 1998 г.). **БФБ**, достоверно повышая содержание РА и аффинность (K_a) РА к А после воздействий ИИ, тем самым «компенсирует» ИИ-эффекты. Следовательно, характеристики А-рецепторов дают возможности разработать экспресс-диагностику для проверки эффективности радиопротекторов.

Выводы и будущие перспективы

Анализ А и параметров А-специфичных белков позволяет: 1) раскрыть ряд механизмов нарушений андрогенной регуляции, индуцируемых ИИ, в т.ч. в условиях неблагоприятной радиоэкологической обстановки, по которым развиваются сбои в проведении анаболических А-сигналов, а как следствие – снижение физиологической активности, адаптационных возможностей и репродуктивного потенциала организма; 2) применить измерения характеристик андроген-специфичных белков для оценки эффективности радиопротекторов; 3) найти способы и средства коррекции гормональных дисфункций через конформационные методы воздействия на андроген-транспортные и рецепторные белки. Несомненно, сфера и методы использования данной области знаний будут расширяться.

Таблица 10.5 – Параметры РА семенников крыс после различных режимов внешнего облучения, воздействий факторов ЗРЗ и эффекты **БФБ** ($M \pm m$) [6а]

Варианты эксперимента		Параметры РА		
		$N_a \times 10^{-13}$, моль на мг белка	$K_a \times 10^8$, М ⁻¹	$\eta_{\text{нш}}$, ед.
³ Н-Т	Интактный контроль	5,4±0,4	2,2±0,2	2,1±0,2
	Через 1 мес. после острого (мощного) γ -облучения (1 Гр от «ИГУР-01»)	12,7±0,3*	2,2±0,1	1,4±0,1*
	Через 1 мес. после низкомощного γ -ИИ (1 Гр от «ГАММАРИД-192/120»)	3,7±0,5*	2,3±0,2	1,3±0,1*
	Контроль без облучения + 1 мес. потребления БФБ	8,1±0,7*	3,8±0,6*	1,1±0,2*
	1 Гр от «ИГУР-01» + 1 мес. БФБ	10,6±0,3*	4,2±0,7*	1,1±0,3*
	1 Гр от «ГАММАРИД-192/120» + 1 мес. БФБ	11,6±0,3*	4,4±0,9*	1,0±0,1*
³ Н-МТ	Интактный контроль	5,9±0,5	5,1±0,3	2,1±0,1
	1 Гр от «ИГУР-01» + 1 мес.	12,3±0,2*	5,3±0,4	1,0±0,3*
	23 сГр в р.т. «Припять»	3,9±0,1*	5,0±0,3	1,3±0,1*
	Контроль (без ИИ) + 1 мес. БФБ	8,8±0,6*	7,6±0,2*	1,1±0,2*
	1 Гр от «ИГУР-01» + 1 мес. БФБ	12,7±0,2*	8,2±0,1*	1,1±0,1*
	23 сГр в р.т. «Припять» + 1 мес. БФБ	6,2±0,4*	8,1±0,2*	1,2±0,1*

Примечание: *различия достоверны ($p < 0,05$).

Лабораторная работа

1. Определение содержания андрогенов

Для определения количественного содержания андрогенов (например, тестостерона) в образцах тканей (в т.ч. сыворотки крови и др.) используют хроматографические методы, применяют диагностические наборы, работающие по принципу конкурентного иммуноанализа (с использованием радиоактивно или люминесцентно меченых гормонов-аналогов), а также тандем-масс-спектрометрию (TD-MS).

2. Измерение параметров ТеСГ крови

Ранее установлено, что в крови основным белком, специфически и с высоким сродством взаимодействующим с молекулами эстрадиола (E_2), является эстроген-связывающий гликопротеин (ЕСГ). Этот белок по своим физико-химическим свойствам существенно отличается от другого секс-стероид-связывающего гликопротеина (ССГ) крови, а именно тестостерон-связывающего глобулина (ТеСГ). Показано, что ЕСГ практически не взаимодействует с 5- α -дигидро-тестостероном (^3H -ДГТ), а связывание молекул E_2 с ТеСГ низкоспецифично (*in vitro* не влияет на результаты определений). Это позволяет применить меченый ^3H -ДГТ для определения качественных и количественных характеристик именно ТеСГ.

Для определения концентрации ТеСГ отработан и принят следующий стандарт измерений: аликвоты образцов сыворотки для удаления эндогенных стероидов обрабатывают (1:1) 15 мин при 37 °С суспензией активированного угля Norit-A с декстраном Т70 (конечн. концентрации – 0,5 и 0,05% соответственно) в буфере С (20 мМ Трис-НСl, 10% глицерин, 10^5 МЕ/л апротинин, рН 7,4), а затем выдерживают 12 мин при 24 °С с ^3H -ДГТ (для насыщения ТеСГ гормоном) в диапазоне физиологических концентраций андрогенов (T_{add}) 0,2÷4,0 нМ и далее инкубируют 90 мин при 4 °С (для стабилизации «равновесия» в системе). Последовательность операций: в пробирки вносят 1,0 мл буфера С, затем 0,1 мл раствора ^3H -ДГТ в буфере С, далее 0,1 мл раствора немеченого ДГТ (в пробах с подавлением 200-кратным избытком немеченого специфического связывания меченого гормона) или 0,1 мл буфера С в пробах без подавления. Реакцию начинают добавлением 0,6 мл разведенного буфером С образца анализируемой (после удаления эндогенных стероидов) сыворотки крови. После окончания инкубации несвязавшийся ДГТ удаляют активированным углем Norit-A с декстраном Т70 (9:1) (конечная концентрация угля – 0,5% и декстрана – 0,05%) добавлением к 1,8 мл инкубационной системы 0,2 мл суспензии активированного угля с магнитной мешалки (сорбция при 4 °С

3 мин). Далее уголь осаждают (3 мин 5000 g), и аликвоты надосадка по 500 мкл отбирают во флаконы из безкальевого стекла, добавляют 10 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8 (или ее аналога) с радиометрией на β -счетчике. Все пробы исполняют параллельно, в дубликатах. Величины специфического связывания ^3H -ДГТ-гормона ($B = B_{\text{sp}}$) определяют как разность между общим ($B_{\text{total}} = B_{\text{t}}$) и неспецифическим (B_{nsp}) его связыванием в системе инкубации, несвязанный ^3H -ДГТ ($U = T_{\text{add}} - B$). Концентрации сайтов специфического связывания ТеСГ (B_{max} , М или N_{a} , моль/мг белка), рассчитывают в координатах Скетчарда аппроксимацией линии зависимости связывания гормона до пересечения с осью абсцисс; в графиках Хилла определяют равновесные константы диссоциации и ассоциации ($K_{\text{d}} = 1/K_{\text{a}}$, М) по точке пересечения линии зависимости связывания меченого гормона с осью $\text{Lg}U$, а кооперативность измеряют по углу наклона ($\eta_{\text{hill}} = \text{ед. tg } \alpha$) (см. рис. 10.6).

3. Измерение параметров рецепторов андрогенов (РА)

Цитозольные фракции клеток органов (в данном случае – крыс-самцов) получают по стандартной методике с измельчением тканей в буферном растворе с ингибиторами протеаз и последующим центрифугированием гомогенатов, причем все действия проводят при 4 °С, что обеспечивает сохранность рецепторных белков. Повторность $\geq 5 \div 6$ животных.

Печень. Вслед за декапитацией и отбором крови вскрывают брюшную полость, перфузируют печень через верхнюю полую вену *in situ* физиологическим раствором до бледно-желтого цвета, после чего извлекают, промывают буфером и помещают в чашку Петри, охлаждаемую на льду. Далее ткань измельчают ножницами и помещают в стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком (зазор 0,5 мм). Соотношение ткань/буфер составляет 1:10 по объему.

Простата. Вентральную долю железы отделяют от прилегающей жировой и соединительно-тканной оболочки, промывают в буфере и взвешивают, предварительно промакнув фильтровальной бумагой. Далее для получения цитозоля клеток ткань от шести и более животных гомогенизируют в буфере (ткань/буфер = 1:5, по объему) в гомогенизаторе со стеклянным пестиком (зазор 0,3 мм).

Семенники (тестикулы). После выделения семенников, освобождения их от туники, ткань измельчают и гомогенизируют в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (при соотношении ткань:буфер = 1:6, по объему).

В процессе гомогенизации используют буферный раствор с рН 7,4 (при 20 °С), содержащий: Трис-НСl – 20 мМ, дитиотрейтол – 500 мкМ, апротинин – 10^5 МЕ/л, глицерин – 10% (v/v), мерсалил натрия – 300 мкМ

(мерсалиловую кислоту растворяют добавлением в буфер 1 н. NaOH с последующим центрифугированием при 105000 g (например, 60 мин при 4 °C на «Beckman L8-50M/E», ротор «Ti-50»). Цитозоли (супернатант, кроме липидной пленки) отбирают через иглу шприцем, чтобы избежать липидной контаминации, и далее используют для анализа характеристик РА гормонзависимых клеток тестикулярных тканей. Мерсалиловая кислота обеспечивает быструю диссоциацию эндогенных гормонов из исходных АРК, далее сорбируемых и удаляемых. Для сорбции цитозоли подвергают 30-минутной обработке при 18÷24 °C декстранпокрытым активированным углем (9:1, конечная концентрация угля – 2,5%). Далее в пробы добавляют α -моно-тиоглицерол (конечная концентрация 25 мМ) для восстановления нативной конформации и андроген-связывающей способности РА. Затем уголь осаждают (5000 g, 4 мин). Эффективность удаления эндо-стероидов (судя по концентрации Т) составляет $\geq 99,8\%$. Аликвоты цитозоля (по 1,0 мл) в буфере (20 мМ Трис-HCl, 10%-ный глицерин, 25 мМ α -моно-тиоглицерол, 10^5 МЕ/л апротинин, pH 7,4 при 20 °C) прогревают 12 мин при 24 °C с ^3H -А (^3H -МТ [или ^3H -ДГТ] с 200-кратным избытком ТА [или ДГТ]) в диапазоне «физиологических» концентраций А (T_{add} 0,2÷4,0 нМ), и далее 120 мин при 4 °C. Снижения связывания ^3H -А (B , М) при 0÷4 °C не наблюдается до 4 сут инкубации. Измерения каждой «точки» осуществляют в 2-х повторностях (дубликатах). Несвязавшийся с белком стероид удаляют адсорбцией (3 мин) суспензией активированного угля Norit-A (0,5%) с декстраном Т70 (0,05%), при постоянном перемешивании. Процедуры – при 4 °C. Супернатант по 0,5 мл переносят во флаконы из безкалиевого стекла и после добавления 10 мл ЖС-8 радиометрируют на β -счетчике. Содержание сайтов специфического связывания ^3H -А (B_{max} , М) и удельное связывание ^3H -А (N_a , моль/мг белка), соответствующие [РА], рассчитывают аппроксимацией линии зависимости до пересечения с осью абсцисс в координатах Скетчарда (рис. 10.6). Для этого специфическое связывание ($B = B_{\text{sp}}$) измеряют как разность между связываниями общим ($B_{\text{total}} = B_t$) и неспецифическим (B_{nsp} , при инкубации с 200-кратн. избытками немеченого ДГТ или МТ). Несвязанный с РА ^3H -А (U) вычисляют как разность между T_{add} и B . В графиках Хилла определяют равновесные константы диссоциации и ассоциации ($K_d = 1/K_a$, М) по точке пересечения линии зависимости связывания ^3H -А с осью LgU , а η_{hill} измеряют по тангенсу угла наклона ($\eta_{\text{hill}} = \text{ед. } \text{tg}\alpha$) (рис. 10.7). Конкурентный анализ влияния немеченых стероидов, его насыщаемость и высокая степень сродства ($K_a \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$) подтверждают специфичность связывания ^3H -А.

4. Определение величин ядерной акцепции андроген-рецепторных комплексов (АРК)

Выделение ядер. Ткань (печень, вентральная простата) измельчается ножницами (до 0,5–2 мм кусочков) и гомогенизируется в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (зазор – 0,2 мм). Гомогенизация ведется в буфере *E* (50 мМ Трис-НCl, 320 мМ сахаразы, 2 мМ дитиотрейтол, 25 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 3000 МЕ/л апротинин, pH 7,4) при соотношении ткань/буфер = 1:2, по объему. Гомогенат отфильтровывается через капроновое сито, центрифугируется 10 мин на подложке 1,7 М сахаразы в буфере *З* (20 мМ Трис-НCl, 1 мМ MgCl₂, 15 мМ KCl, 1700 мМ сахаразы, pH 7,4) и осадок ресуспендируется в 5 мл смеси (9:1) буферов *З* и *E* для приведения концентрации сахаразы до 1,5÷1,6 М. Эту суспензию наслаивают на 5 мл буфера *З*, нарушая границу градиента стеклянной палочкой. Сверху пробирки заполняют буфером *E* и центрифугируют (100000 g 90 мин 4 °C) в бакет-роторе. После центрифугирования супернатант удаляют, а ядра (осадок) ресуспендируют в буфере *E* и наслаивают на 10 мл 1 М сахарозного буфера (полученного смешиванием 1:1 буфера *E* с буфером *З*). Ядра осаждают при 2500 g в течение 10 мин, ресуспендируют в буфере *E* и хранят при 2 °C (но не более суток) до использования в опыте. Чистоту ядер контролируют под микроскопом в камере Горяева. Перед использованием суспензии ядер клеток приводят к одинаковой концентрации по оценке содержания ДНК (10,6 и 14,5 × 10⁴ ядер/мкг ДНК соответственно для печени и простаты), определяемой после лизиса ядер в 1% растворе додецилсульфата натрия.

Получение (АРК). Цитозоли клеток печени и простаты выделяют с использованием буфера *E*. Полученный цитозоль предварительно освобождают от эндогенных стероидов обработкой 9:1 (15 мин при 24 °C) суспензией угля Norit-A с декстраном T70 в соотношении 9:1 (конечные концентрации угля Norit-A – 0,5% и декстрана – 0,05%). После центрифугирования (5000 g, 3 мин) цитозоль инкубируют с ³H-A (это ³H-MT {+ ТА [8 мМ]}; реже – с ³H-ДГТ) в отсутствие и с добавлением 250-кратного избытка немеченого гормона-аналога. Концентрация метки в системе инкубации составляет 76 нМ. Инкубацию проводят в течение 12 мин при 24 °C и далее 90 мин при 4 °C с последующим удалением несвязанного гормона обработкой суспензией покрытого декстраном активированного угля (Norit-A – 0,5%, декстран T70 – 0,05%) за 3 мин. Уголь осаждают (5000 g, 3 мин). Супернатант, содержащий АРК, используют в дальнейшем анализе. [АРК] определяют по величине специфического связывания.

Оценка транслокации и ядерной акцепции АРК. Перед инкубацией с ядрами препараты АРК для их активации прогревают 30 мин при 25 °С. В последующем предварительно приведенные к одинаковой концентрации суспензии ядер и АРК разных групп смешивают и инкубируют с встряхиванием в буфере *E* 60 мин при 4 °С. Состав инкубационной системы: цитозоль (АРК) – 300 мкл; суспензия ядер – 500 мкл. Содержание белка в цитозоле ~32 мг/мл для печени и ~24 мг/мл для простаты; при этом концентрация ^3H -АРК и ядер в системе инкубации ~48 фмоль/мг белка и ~0,93 мг ДНК/мл в случае печени, а в случае простаты ~39 фмоль/мг белка и ~0,22 мг ДНК/мл. После инкубации ядра осаждают (1000 g, 5 мин) и дважды отмывают в 1 мл буфера (20 mM Трис- HCl , 600 mM KCl , 5 mM CaCl_2 , pH 7,4), причем во второй раз с добавлением тритона X-100 (0,3% в конечной концентрации). Данная процедура помимо отмывки ядер избавляет от наружной ядерной мембраны и сорбированных на ней рецепторных комплексов. Для экстракции гормона ядра 30 мин обрабатывают 2 мл этанола. Аликвоты проб по 0,5 мл (транслоцированные АРК) переносят во флаконы для счета из безкалиевого стекла и добавляли 5 мл сцинтилляционной жидкости (4,0 г ППО; 0,2 г ПОПОП; 60,0 г нафталина; 0,96 л диоксана) или ее аналога (ЖС-8). Определение транслокационной акцепции (по радиоактивности) проводят на β -счетчике. Контролем служат данные связывания ^3H -АРК (счет), где ядра были предварительно насыщены 100-кратным избытком немеченых АРК-ДГТ.

Концентрация белка (C) проб измеряется по Лоури и по разности абсорбций (*A*) спектрофотометрически по формуле Калькара:

$$C_{\text{белка}} (\text{мг/мл}) = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}.$$

Концентрация ДНК определяется по Спирину: к препаратам ядер (1,0 мл) добавляют 1,0 мл 0,5M NaOH , инкубируют 2 часа при 37 °С; охлаждают до 4 °С, добавляют 0,15 мл 57%-й ледяной HClO_4 и затем центрифугируют 3 мин при 12000 g; к осадку приливают 1,0 мл 5%-й HClO_4 и 10 мин выдерживают в ледяной бане, еще центрифугируют 3 мин при 12000 g; к супернатанту (1,0 мл) добавляют 2,0 мл 5%-й HClO_4 и измеряют величины оптической плотности (*D*) при длинах волн равных 270 нм и 290 нм на спектрофотометре. [ДНК] считают по формуле:

$$\text{ДНК} (\text{мкг/мл}) = 159 \times (D_{270} - D_{290}).$$

Контрольные вопросы

1. Дайте определение и опишите химическое строение андрогенов.
2. Какие белки участвуют в транспорте андрогенов?
3. Опишите строение рецепторов к андрогенам.
4. Как осуществляется регуляция андрогенами?
5. Какова зависимость андрогенного статуса от параметров действия ионизирующего излучения?
6. Опишите «эстафету» передачи андрогенов с TeCG на внутриклеточные рецепторы.
7. Как влияет ионизирующее излучение на цитоторецепцию в семенниках, простате и печени?
8. Объясните схему индуцированного ионизирующей радиацией нарушения андроген-рецепторного цикла.
9. Как оценивают количество тестостерон-связывающего глобулина?
10. Как измеряют параметры рецепторов андрогенов?
11. Как оценивают величины ядерной акцепции андроген-рецепторных комплексов?
12. Опишите метод определения концентрации ДНК по Спируну.

Литература

1. Гончаров, Н.П. Современные методы определения тестостерона / Н.П. Гончаров, Г.В. Кация // Андрология и генитальная хирургия. – 2008. – № 2. – С. 27–37.
2. Конопля, Е.Ф. Влияние йода-131 на характеристики связывания половых и тиреоидных гормонов белками плазмы крови у детей с функциональным нарушением щитовидной железы в результате аварии на Чернобыльской АЭС // Е.Ф. Конопля [и др.] // Радиобиология. – 1992. – Т. 32, вып. 4. – С. 488–492.
3. Konoplya, E.F. Identification of the androgen receptor in liver and prostate cell plasma membranes / E.F. Konoplya, E.H. Popoff // Int. J. Biochem. – 1992. – Vol. 24, № 12. – P. 1979–1983.
4. Konoplya, E.F. Consequences of radioactive contamination on flora & fauna in the exclusion zone / E.F. Konoplya, E.H. Popoff, L.K. Sechko, L.N. Nikolaevich // Proc. Int. Symp. «One decade after Chernobyl», Vienna (Austria), 14–19 Apr. 1996. – Vienna: IAEA. – 1996. – Ch. 3. – P. 1–16.
5. Наумов, А.Д. Диагностика нарушений в системе эндокринной регуляции репродуктивной функции на основании оценки состояния системы транспорта гормонов в крови / А.Д. Наумов, Е.Г. Попов // Сб. докл. на-

- учн.-практич. конф. «Проблемы научно-инновационного развития Витебской области». – Минск: ГКНТ РБ, 1999. – С. 201–203.
6. а) Попов, Е.Г. Использование стероидрецепторных систем для определения эффективности радиопротекторных препаратов / Е.Г. Попов // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2000. – № 2. – С. 79–82;
б) Попов, Е.Г. Влияние низкоинтенсивных радиационных воздействий на акцепцию андроген-рецепторных комплексов ядрами клеток-мишеней печени и простаты / Е.Г. Попов // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2000. – № 3. – С. 87–90.
 7. Попов, Е.Г. Сексстероид-связывающий гликопротеин крови человека: анализ молекулярных характеристик и возможности фармакологической регуляции его функций / Е.Г. Попов, А.Д. Наумов, Л.Ф. Клундук // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2002. – № 4. – С. 64–68.
 8. Попов, Е.Г. Влияние радиоэкологической обстановки и экспериментального гипертиреозного состояния на показатели рецепции андрогенов в семенниках и предстательной железе крыс / Е.Г. Попов, Ф.И. Куц, О.Л. Белоусов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 1. – С. 86–91.
 9. Попов, Е.Г. Изучение кооперативных характеристик рецептора андрогенов / Е.Г. Попов // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, № 3. – С. 284–292.
 10. Попов, Е.Г. Молекулярные характеристики тестостерон-связывающего глобулина крови и возможности их регуляции / Е.Г. Попов, А.Н. Капич // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54, № 3. – С. 349–360.
 11. Попов, Е.Г. Влияние радиоэкологических факторов на показатели андроген-зависимой регуляции организма у облученных родителей и их потомков / Е.Г. Попов, В.В. Селявко // Экологич. вестник. – 2009. – № 3/4. – С. 59–68.
 12. Ярмоненко, С.П. Радиобиология человека и животных / С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон. – М.: Высш. шк., 2004. – 549 с.
 13. Popoff, E.N. The effect of ionizing radiation on testosterone binding globulin characteristics: correction of the protein's parameters by lipid polyene complexes of fungus *Laetiporus sulfureus* / E.N. Popoff, A.N. Kapich // Int. J. Radiat. Biol. – 2010. – Vol. 86, № 3. – P. 238–251.
 14. Yeh, S.Y. Cloning & characterization of a specific coactivator, ARA(70), for the AR in prostate cells / S.Y. Yeh, C.S. Chang // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93, № 11. – P. 5517–5521.

Г Л А В А 11. СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ РЕГУЛЯЦИИ СОСУДИСТОГО ТОНУСА

1. Эндотелиальные вазоактивные факторы

1.1. Открытие биологической активности оксида азота

Оксид азота (NO) – бесцветный реакционноспособный газ, образующийся из азота и кислорода воздуха при грозах и ядерных взрывах в атмосфере и синтезируемый в крупнотоннажном производстве азотной кислоты каталитическим окислением аммиака. Будучи одним из немногих стабильных свободных радикалов, NO долгое время рассматривался как ядовитое, опасное для жизни вещество, диаметрально противоположное чему-либо связанному с жизнью. Традиционные программы химического образования весьма способствовали выработке познавательного неприятия биогенного NO как любой молекулы с нечетным числом электронов. Ставшая общеизвестной канцерогенность нитрозаминов, присутствие оксидов азота в табачном дыме и в выхлопных газах, контроль содержания нитратов и нитритов в овощах, обоснованно пропагандируемый экологами и реально осуществляемый в большинстве цивилизованных стран, действительно, создают NO незавидную репутацию. Одним из неожиданных открытий в биохимии в последнее время было обнаружение в 1987 году синтеза монооксида азота клетками млекопитающих. Позднее биосинтез NO был обнаружен у беспозвоночных и, видимо, имеется у большинства представителей животного царства.

К середине 80-х годов XX века усилиями многочисленных исследователей в биологии сложилась достаточно стройная картина системы регуляции клеточного и тканевого метаболизма. Она включала в себя клеточные рецепторы, расположенные на внешней стороне клеточной мембраны, реагирующие на гормоны, цитокины и другие биологически активные агенты. С помощью специального внутримембранного белка, выполняющего сигнальные функции (белки этого типа относятся к классу так называемых G-белков), сигнал от рецепторов передается на другие белки. Эти белки, связанные с внутренней стороной клеточной мембраны, в свою очередь обеспечивают синтез так называемых вторичных мессенджеров – циклических нуклеотидов, продуктов распада фосфатидилинозитола. Последние и ионы кальция, поступающие в цитозоль, осуществляют регуляцию клеточного метаболизма. Среди вторичных мессенджеров особое место занимают циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), образующийся из АТФ при действии аденилатциклазы и циклический гуанозинмонофос-

фат (цГМФ), возникающий из ГТФ с помощью гуанилатциклазы (по современной терминологии, гуанилилциклазы). Особый интерес вызывало сосудорасширяющее действие цГМФ, обусловленное высвобождением из гладкой мускулатуры сосудов внутриклеточного кальция. При выделении гуанилилциклазы было установлено, что наряду с мембраносвязанной формой фермента существует и его водорастворимая форма, достаточно активно продуцирующая цГМФ из ГТФ. Обнаружение этой формы не соответствовало сложившимся к тому времени представлениям о механизме синтеза вторичных мессенджеров, предполагавшего мембраносвязанную природу ферментов, ответственных за образование цГМФ. Оказалось, что растворимая гуанилилциклаза активируется под влиянием различных водорастворимых соединений без участия соединений, вызывающих активацию клеточных рецепторов. Среди них были лекарственные соединения типа органических нитратов и нитропруссид натрия, известные своим сосудорасширяющим (вазодилатирующим) действием. Первое время полагали, что эти лекарства действуют на гуанилилциклазу как агенты, влияющие на окислительно-восстановительное состояние тиоловых групп молекулы гуанилилциклазы. Однако сопоставление активации этого фермента, с одной стороны, органическими нитратами и особенно нитропруссидом натрия, содержащими соответственно нитро- или нитрозогруппы, и, с другой стороны, различными редокс-агентами, окисляющими или восстанавливающими соответственно тиоловые или ди-сульфидные группы в белках, показало существенно более резко выраженное действие на фермент органических нитратов и нитропрусида. Этот результат позволил группе американских исследователей во главе с Феридом Мьюрэдом в конце 1970-х годов предположить, что высокая активность нитро- и нитрозосодержащих сердечно-сосудистых лекарств обусловлена их способностью продуцировать оксид азота (NO), который и является активатором гуанилилциклазы. Было предположено, что связывание NO с этой группой приводит к конформационным изменениям гуанилилциклазы, что и вызывает ее активацию. Эксперименты по обработке гуанилилциклазы газообразным оксидом азота полностью подтвердили высказанное предположение. Таким образом, впервые было продемонстрировано положительное биологическое действие NO.

Результаты группы Ф. Мьюрэда позволили понять механизм сердечно-сосудистого действия органических нитратов и среди них наиболее известного – нитроглицерина, использовавшегося в медицине уже более сотни лет. Стало ясно, что способность нитроглицерина купировать сосудистые спазмы обусловлена образованием из него оксида азота. Активация последним гуанилилциклазы обеспечивает накопление цГМФ, запускающего цепь биохимических процессов.

мических процессов, приводящих к выбросу кальция из гладкомышечных клеток сосудов и тем самым к их расслаблению (вазодилатации).

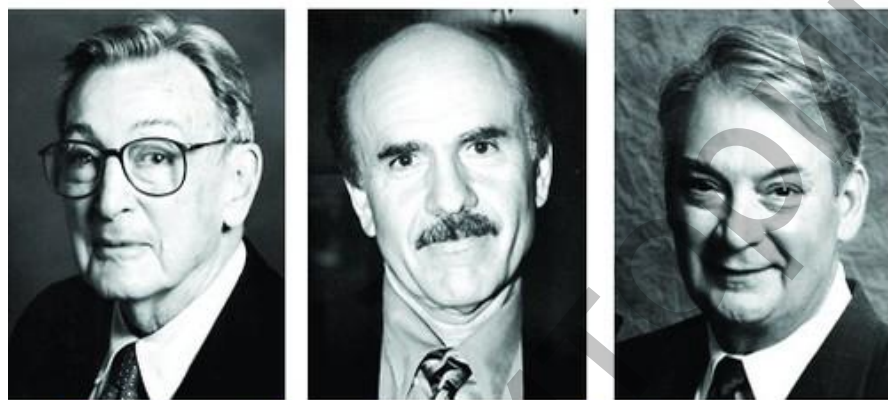
Интересно, что еще в конце 70-х годов XX века Ф. Мьюрэд предположил, что оксид азота как регулятор гуанилилциклазы может продуцироваться в организме животных и человека не только из внешних (экзогенных), но и из эндогенных источников. Иными словами, NO может продуцироваться как регулятор жизнедеятельности сердечно-сосудистой системы естественным образом, в ходе метаболических процессов. Аналогичное предположение высказывалось в то же время и другим исследователем гуанилилциклазы — ныне покойным немецким ученым Эйком Бёме. Это предвидение блестяще подтвердилось в дальнейшем.

К этому времени в другой области биологии — иммунологии — было обнаружено накопление нитратов и нитритов в среде инкубации иммуноактивных макрофагов (то есть макрофагов, способных обеспечивать ответ системы клеточного иммунитета). Накопление нитратов и нитритов коррелировало с цитотоксическим действием макрофагов на клетки-мишени. Позже было показано, что нитраты и нитриты появляются в этой системе как продукты окисления оксида азота, продуцируемого активированными макрофагами, который и ответственен за их цитотоксическое действие.

Решающий прорыв, определивший бурное развитие новой отрасли биологии — биологии оксида азота, был сделан американским физиологом Робертом Форчготтом. В 1980 году в журнале «Nature» появилась его статья, в которой сообщалось об открытии в изолированных кровеносных сосудах так называемого эндотелиального фактора релаксации сосудов (ЭФРС, английский термин — «endothelium-derived relaxing factor», EDRF). Этот агент продуцировался в клетках кровеносных сосудов, выстилающих внутреннюю сторону сосуда (так называемые эндотелиальные клетки), в ответ на ацетилхолин, брадикинин и другие биологически активные вещества и вызывал расслабление гладкой мускулатуры сосудов. Время жизни ЭФРС оказалось чрезвычайно коротким: в экспериментах с сосудом-донором ЭФРС и удаленным от него предварительно сокращенным сосудом-акцептором ЭФРС последний оказывал вазодилататорное действие на сосуд-акцептор только в течение 6 с (время движения капли физиологического раствора с ЭФРС от сосуда-донора к сосуду-акцептору). За это время вазодилатирующая активность этой капли снижалась до нуля. Короткое время жизни ЭФРС в значительной степени определяется его взаимодействием с активными метаболитами кислорода, образующимися в клетках и тканях в ходе их жизнедеятельности [1].

Выяснению природы ЭФРС способствовали данные группы Ф. Мьюрэда о вазодилатирующей активности оксида азота, а также предыдущие исследования самого Р. Форчготта, изучавшего вазодилататорное действие нитрита натрия (NaNO_2). Действие NaNO_2 резко возрастало при фотолизе нитрита, приводившего к генерации NO. Через 6 лет после открытия ЭФРС Р. Форчготт с сотрудниками показали, что поведение этого агента как вазодилататора напоминает поведение NO. Отсюда было сделано предположение, что ЭФРС или идентичен NO, или последний является составляющей частью ЭФРС. Аналогичное предположение одновременно с Р. Форчготтом было сделано американским фармакологом и физиологом Луисом Игнарро, активно изучавшим ЭФРС и назвавшим его оксидом азота эндотелиального происхождения (endothelium-derived nitric oxide, EDNO).

Вскоре эта гипотеза была проверена группой Сальвадора Монкады, использовавшей для регистрации NO метод хемилюминесцентного анализа



Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad.
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998 for their
discoveries concerning nitric oxide as a signalling molecule in
the cardiovascular system

Рис. 11.1. Нобелевские лауреаты по физиологии и медицине. 1998 год.

(свечение продукта реакции NO с озоном). В капле с ЭФРС, снятой с культуры эндотелиальных клеток, адсорбированных на шариках смолы и активированных брадикинином, они действительно обнаружили оксид азота. Более того, было показано, что оксид азота, обнаруживаемый

в препарате ЭФРС и подведенный в том же количестве в свободном виде к предварительно сокращенному сосуду, вызывает такое же его расслабление, как и сам ЭФРС. Отсюда был сделан вывод об идентичности ЭФРС и NO. Вскоре после этого английские исследователи (Джон Гарствэйт с сотрудниками) обнаружили, что срезы ткани мозга животных при их возбуждении выделяют вещество, способное аналогично ЭФРС расслаблять изолированные сосуды. Активным компонентом этого вещества оказался тот же оксид азота.

Спустя 18 лет после выяснения роли NO в механизмах регуляции сердечно-сосудистой системы, в 1998 году, три американских ученых Р. Форчготт, Л. Игнарро и Ф. Мьюрэд были удостоены Нобелевской премии в области физиологии и медицины (рис. 11.1).

1.2. Синтез NO из L-аргинина; изоферменты NO-синтазы

Направление биологической эволюции, как известно, определяются физико-химическими и биологическими факторами. Эволюция биохимических

систем, в том числе и NO-синтазных и нитритредуктазных, началась с простых соединений, которые входили в состав первобытной атмосферы и гидросферы. Анализ NO-синтазных реакций показывает, что в ходе этих реакций из гуанидинового азота (NH_2 -группа) L-аргинина через промежуточное соединение – гидроксил-L-аргинин (OH-L-аргинин) – образуется NO (рис. 11.2).

Выделены химические группировки, которые участвуют в реакции. Согласно существующим представлениям, одним из наиболее важных этапов в NO-синтазной реакции является окисление гуанидинового азота при участии супероксидных анион-радикалов, образующихся на домене P-450 NO-синтазы. Затем гидроксилированная форма L-аргинина превращается в L-цитруллин с одновременным

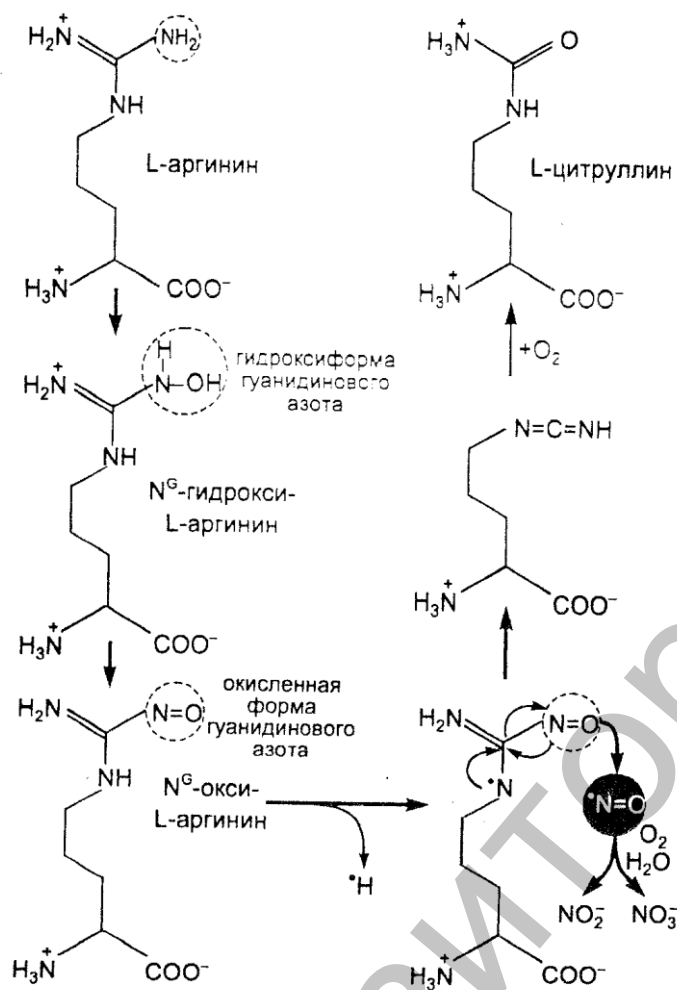
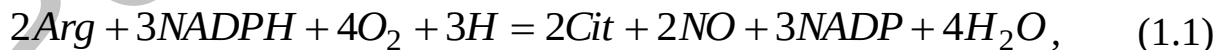


Рис. 11.2. Образование оксида азота в организме млекопитающих при участии NO-синтазы.

образованием NO, который затем в присутствии кислорода и его активированных форм превращается в ионы NO_2 и NO_3 .

В клетках млекопитающих NO синтезируется из L-аргинина. Схематично реакцию синтеза NO можно представить в виде уравнения (1.1):



где Arg – аргинин; Cit – цитруллин.

Катализируют эту реакцию семейство ферментов, называемых NO-синтазами (NOS).

Каждый мономер NOS состоит из двух доменов (рис. 11.3): оксигеназного и редуктазного. Каждая подъединица скрепляется цинковым ио-

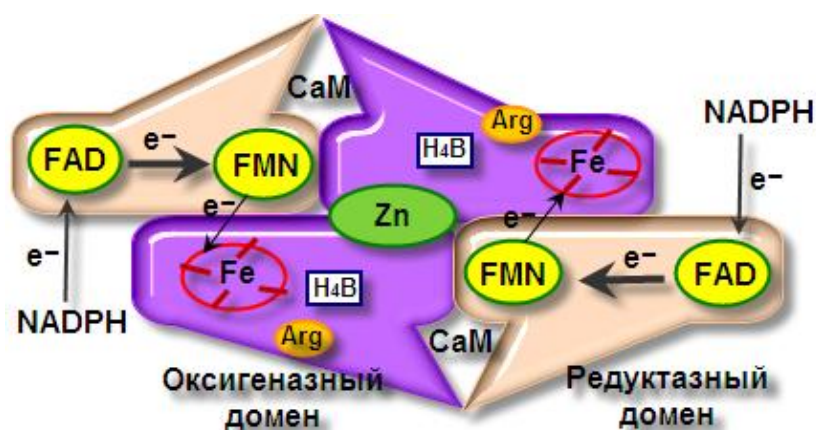


Рис. 11.3. Структура димера NO-синтазы.

ном, который связан двумя цистеинами от каждого оксигеназного домена. Кальмодулин (CaM) связывает области доменов между собой. Редуктазный домен поставляет электроны для NOS реакции, которая протекает в оксигеназном домене. Домен редуктазы состоит из двух редокс-активных просте-

тических групп – ФАД и ФМН. НАДФН+H⁺ передает электрон ФАД, который передает электрон на ФМН, который затем передает электрон на гемсодержащую группу (Fe) (рис. 11.4а) оксигеназного домена на противоположной подъединице. Оксигеназный домен содержит 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (H₄B) (рис. 11.4б) и уже упомянутую гемсодержащую группу. Это также редокс-активные группы. Помимо гема и H₄B оксигеназный домен связывает L-аргинин (Arg) основания, который принимает участие в NO-синтазной реакции (рис. 11.5).

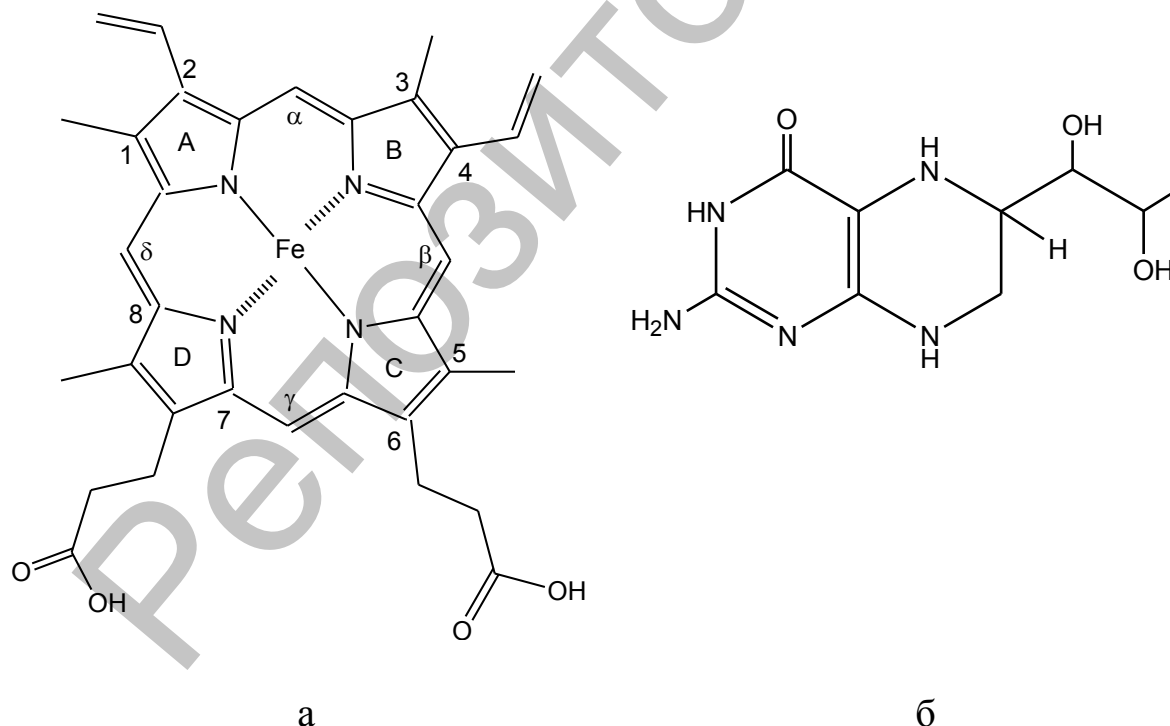


Рис. 11.4. Структура гема (а), структура тетрагидробиоптерина (б).

Регуляция NO-синтазы

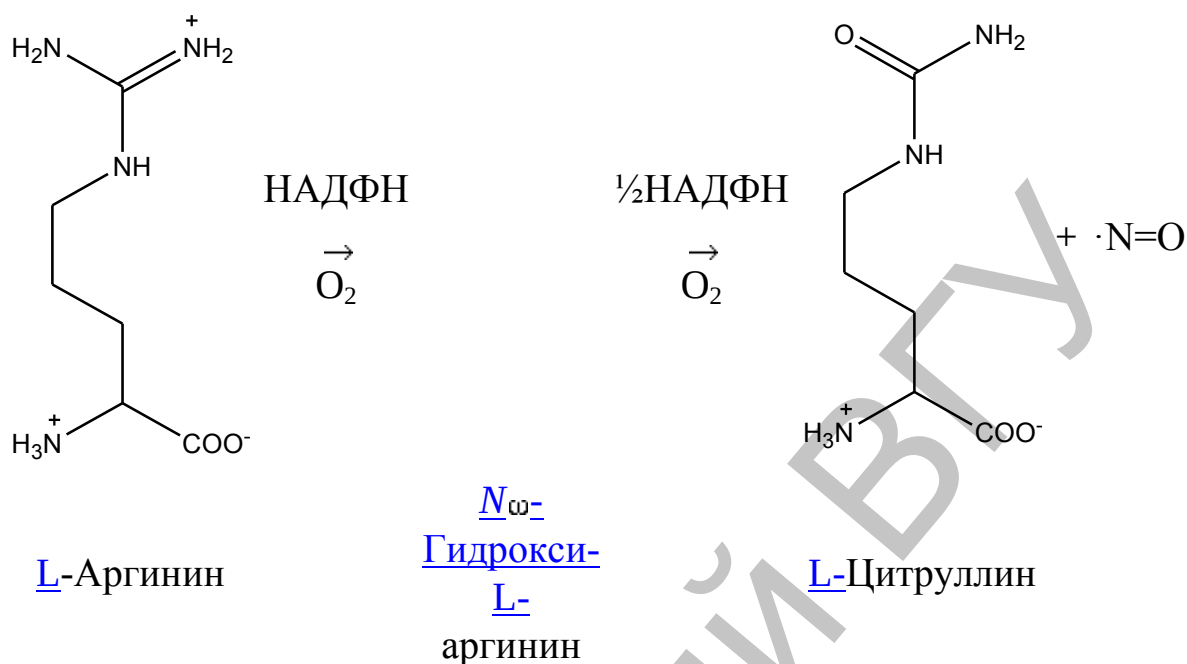
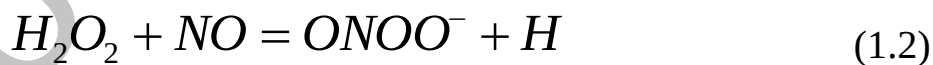


Рис. 11.5. Схема NO-синтазной реакции.

Итак в синтезе NO участвует ряд кофакторов: тиолатсвязанный гем, ФАД, ФМН, 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин, глутатион (возможно), кальмодулин и кальций (является коферментом только для NOS-3). В зависимости от количества доступных кофакторов и аргинина реакция может протекать с образованием NO, с образованием пероксидов, а также параллельным синтезом NO и пероксидов. Эти два продукта способны взаимодействовать между собой согласно уравнению (1.2):



Реакция протекает оптимально при эквимольных количествах субстратов, при этом образуется пероксинитрит (ONOO⁻) [2]. Она идет в 3 раза быстрее, чем катаболизм супероксида при помощи супероксиддисмутазы. При физиологических уровнях NO образуется в пико- либо наномольных концентрациях и поэтому преобладает связывание супероксид-анионов супероксиддисмутазой. ONOO⁻ образуется в этом случае в минимальных количествах.

NOS 1-го типа – нейрональная (название дано по месту первого обнаружения), белок с молекулярной массой 130 кД. Кроме нервной ткани, NOS-1 экспрессируется в скелетных мышцах, кардиомиоцитах, эпителии

бронхов и трахеи. NOS-1 – конституциональный фермент, уровень его экспрессии в некоторой степени может регулироваться концентрацией в клетке ионов кальция. Фермент участвует в обеспечении механизмов памяти, модуляции болевого раздражения, координации между нервной активностью и сосудистым тонусом. При избирательном блокировании NOS-1 повышаются агрессивность и сексуальность животных, увеличивается частота небольших церебральных инфарктов.

Второй тип – NOS-2, впервые выделенная из активированных лейкоцитов, гомодимер с молекулярной массой 135 кД. Обнаружена в кардиомиоцитах, эндотелиоцитах, гладкомышечных клетках, гепатоцитах, однако основным ее источником являются макрофаги. NOS-2 – индуцибельный фермент, уровень активности которого не зависит от концентрации внутриклеточного кальция. Основные индукторы NOS-2 – воспалительные цитокины, эндотоксины, некоторые компоненты клеточной стенки грамположительных бактерий, механическое повреждение сосудистой стенки, беременность. Следствием индукции NOS-2 является усиление кровотока в очагах воспаления, при гиперпродукции NO возможна полная потеря сосудистой реактивности на прессорные стимулы вплоть до развития септического шока (это единственная форма NOS, способная синтезировать цитотоксические уровни NO, так как в ее структуре отсутствует аутоингибирующая последовательность). В некоторых тканях, например, бронхиальном эпителии человека, почках крысы, ряде фетальных тканей NOS-2 – конституциональный фермент. Экспериментальная блокада NOS-2 приводит к повышению чувствительности организма к инфекции, ослаблению, но не полной утрате гипотензивного эффекта эндотоксина.

Третий тип NOS – эндотелиальная NO-синтаза (также названная по месту первого обнаружения) с молекулярной массой 160 кД, конституциональный мембраносвязанный фермент, регулируемый уровнем ионов кальция. NOS-3 помимо эндотелиальных клеток встречается в целом ряде тканей (рис. 11.6).

В сердечной мышце NOS-3 может вмешиваться в нейрогуморальный контроль сократимости миокарда. Отрицательный хронотропный эффект М-холинергических средств обусловлен активацией NOS-3 и влиянием NO на L-тип Ca^{2+} -каналов в пейсмекерных кардиомиоцитах, положительный инотропный эффект β -агонистов связан с усилением ингибирования NOS-3 [3]. Считается, что NOS-3 – конституциональный фермент, показана возможность его индукции при некоторых состояниях – беременности (индукция NOS-3 наряду с увеличением NOS-2), длительном хроническом увеличении кровотока. Блокада NOS-3 не приводит к развитию сердечно-сосудистых

аномалий, однако способствует нарушению регуляции сосудистого тонуса: у экспериментальных животных отмечается умеренное повышение АД, эндотелийзависимая релаксация в ответ на ацетилхолин блокируется, не повреждается эндотелийзависимая релаксация на нитропруссид натрия.

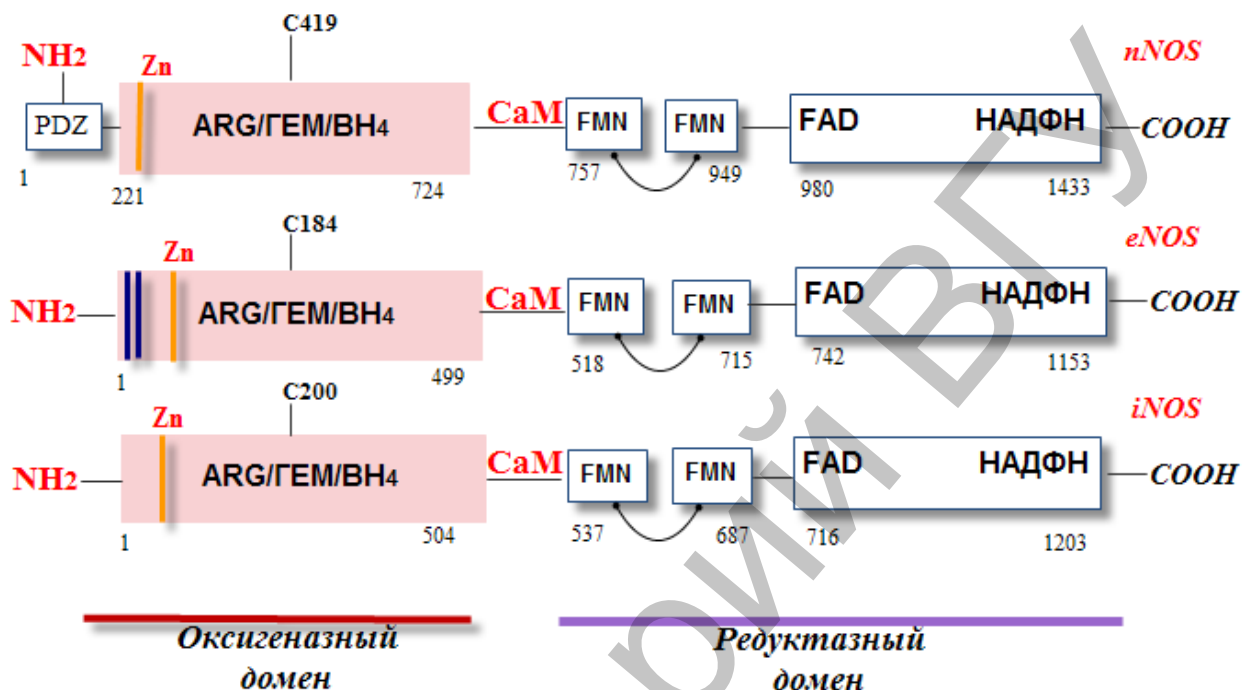


Рис. 11.6. Структура nNOS, eNOS и iNOS человека.

NOS-3 – мембраносвязанный белок, причем ее цитозольные формы неактивны. Зависимость активности NOS-3 от мембранной локализации, вероятно, является следствием того, что фермент связывается не с любым участком плазмолеммы, а с кавеолами. Кавеола – это маленькая инвагинация плазматической мембраны, характеризующаяся специфической липидной композицией (большое количество холестерина, сфинголипидов, сайтов связывания сигнальных белков – G-белков, инозитол-3-фосфата, протеинкиназ) и имеющая трансмембранный белок кавеолин, способный формировать белковые «подмости» для органелл, связываться с цитоскелетом. Кавеолы локализуются преимущественно в мембранах эндотелиоцитов, однако они найдены также в кардиомиоцитах, адипоцитах и некоторых других клетках. Мембранные фосфолипиды (в частности, фосфатидилсерин) значительно ослабляют ферментативную активность NOS-3, отсюда следует, что при перемещении депальмитрированной NOS-3 из кавеолы в некавеолярную мембрану, богатую фосфолипидами, активность фермента может снижаться [4].

Механизм действия NO- в клетке. В клетках эукариот выявлены 3 основных типа внутриклеточных рецепторных белков, с которыми взаимодействует цГМФ: цГМФ-зависимые протеинкиназы (протеинкиназы G), цГМФ-регулируемые ионные каналы и цГМФ-регулируемые фосфодиэстеразы. цГМФ является участником Ca^{2+} сигнализации в различных типах клеток. В настоящее время показано, что цГМФ опосредует эффекты широкого спектра гормонов, натрийуретических пептидов, лекарственных средств и токсинов в различных типах клеток.

Действие монооксида азота может также осуществляться через механизмы, не связанные с активацией растворимой гуанилатциклазы: NO способен активировать АДФ-рибозил-трансферазу, что вызывает рибозилирование цитозольного фермента глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы и снижение его активности. В результате нарушаются процессы аэробного гликолиза на стадии образования 1,3-бисфосфоглицерата и уменьшается образование АТФ. Наряду с этим монооксид азота и/или пероксинитрит приводят к ингибированию активности митохондриального электронно-транспортного комплекса I и II, аконитазы, АТФ-синтазы и цитохромоксидазы. Считается, что только значительные концентрации оксида азота или пероксинитрита вызывают снижение тонуса кровеносных сосудов вследствие необратимого нарушения образования АТФ в митохондриях гладкомышечных клеток [2].

Положительные эффекты, вызванные действием небольших концентраций пероксинитрита, объясняют нитрозилированием тиолсодержащих соединений, а также взаимодействием его со спиртовыми группами, в результате чего образуется депо монооксида азота [5]. Взаимодействие монооксида азота с тиолсодержащими соединениями и гемсодержащими протеинами также существенным образом продлевает время существования его молекулы, считается, что динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы являются физиологически активными депо NO [6].

1.3. Нитритредуктазная система синтеза оксида азота

В настоящее время трудно объяснить неоднозначное действие оксида азота. Многие непонятные явления и противоречивые на первый взгляд факты можно понять, опираясь на концепцию цикла оксида азота. Согласно этой концепции, превращение NO в другие азотосодержащие соединения – NO_2 , NO_3 , NO^+ , NO , NO_2^+ радикал и т.д. осуществляется в ходе окислительно-восстановительных реакций, протекающих в виде метаболического цикла. Этот метаболический цикл может активизироваться при различных состояниях, протекающих на фоне гипоксии. Такая сильная зависимость цикла оксида азота от концентрации кислорода связана с тем, что

активация процессов восстановления нитритов в NO осуществляется при участии гемсодержащих белков, способных связывать кислород. В отсутствие кислорода или в условиях его дефицита восстановленные гемсодержащие белки начинают переносить электроны на ионы NO₂, которые в свою очередь восстанавливаются в NO. Множественность эффектов NO в концепции цикла оксида азота объясняется наличием достаточно большого количества продуктов метаболизма оксида азота (NO₂, NO₃, NO⁺, NO, NO₂⁺-радикал и т.д.), которые могут приводить к различным биологическим эффектам.

1.4. Методы изучения метаболизма оксида азота

Определение продуктов окисления NO (концентрации нитритов и нитратов). Вследствие быстрого перехода в нитраты и нитриты свободный радикал NO имеет короткий период полужизни (5–30 секунд), что объясняет трудности его выявления в биологических жидкостях. Сумму конечных продуктов окисления NO (нитритов/нитратов) в биологических жидкостях определяют с помощью реактива Грисса (1% сульфаниламида, 0,1% нафтилендиамина, 2,5% фосфорной кислоты), а абсорбцию раствора измеряют при длине волны 546 нм. Содержание только нитритов (нитрит-аниона) в биологических жидкостях также определяют с помощью реактива Грисса путем восстановления нитратов до нитритов, используя кадмиевые колонки размером 60 × 5 мм. Восстанавливать нитраты в нитриты можно и при помощи цинковой пыли в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди [7].

Среднее содержание нитритов/нитратов в крови и в моче – 50 мкмоль. У детей нормальный уровень метаболитов NO в крови достигает ~25 (20–28) мкмоль. Необходимо отметить, что у новорожденных в дневные часы концентрация нитритов/нитратов в моче составляет всего 2–3 нмоль/мл, тогда как ночью она повышается до 14–16 нмоль/мл. Показатели нитритов/нитратов в моче здоровых людей равномерно распределяются в течение суток и не зависят от их пола и возраста. Параметры с поправкой на экскрецию креатинина (кр) и выраженные в логарифмической шкале составляют для нитритов 17–22 пмоль/г/кр, а для нитратов – 1–3 пмоль/г/кр [8]. С возрастом в большинстве клеток организма происходит угнетение синтеза NO вследствие подавления активности NO-синтазы (NOS), и у лиц старше 75 лет NO-емия в 3–4 раза ниже, чем у 25–30-летних людей [9]. Уменьшение процессов синтеза NO является одним из физиологических механизмов старения организма. Необходимо отметить, что концентрация в крови нитритов/нитратов повышается при увеличении уровня эстрогенемии. Так, у женщин в позднюю секреторную фазу менструально-

го цикла содержание NO выше, чем в пролиферативную, а при нормально протекающей беременности показатели NO больше, чем у небеременных.

Показатель NO-опосредованных белковых модификаций. Метаболиты NO могут ложно повышаться из-за диеты и медикаментов, содержащих азотистые продукты, а также вариабельно уменьшаться под действием плазменных тиолов. Это делает менее надежным определение нитритов/нитратов в крови. Косвенным показателем NO-опосредованных белковых модификаций служит концентрация 3-нитротирозина, который не зависит от поступления экзогенных метаболитов NO и эффектов плазменных тиолов. A. Wanchu et. al. в качестве маркеров уровня метаболитов NO в крови придают особое значение спектрофотометрическому определению азота и цитруллина. У здоровых людей эти параметры соответственно составляют ~203 нмоль/мл и ~217 нмоль/мл [10].

Активность NO-синтазы в плазме крови определяют с помощью биохимического (колориметрического) метода. В клетках крови здоровых людей активность NOS очень низка, но ряд веществ способен вызвать индукцию высокого уровня фермента.

Определение НАДФН₂-диафоразы. НАДФН₂-диафораза является маркером NOS, и гистохимическое определение этого фермента используется для локализации мест синтеза «новой» сигнальной молекулы NO. Активности НАДФН₂-диафоразы и NOS меняются синхронно и однонаправленно в соответствии с уровнем секреции NO. Поэтому по активности НАДФН₂-диафоразы судят об активности NOS и NO-образующей функции клетки. После выделения и очистки нейрональной НАДФН₂-диафоразы доказано, что очищенный белок является кальций-кальмодулинзависимой нейрональной NOS. Расшифровка строения протеина и молекулярное клонирование позволили получить специфические антитела, с помощью которых показано, что в большинстве случаев NOS локализуется с НАДФН₂-диафоразой, а несовпадение локализации связано с изменением условий реакции. Гистохимически определение НАДФН₂-диафоразы проводят тетразолиевым методом [11].

Прямой количественный метод электронно парамагнитного резонанса (ЭПР) позволяет определить в тканях скорость генерации NO по включению в комплексы с двухвалентным железом и диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) и дальнейшим образованием парамагнитных мононитрозильных комплексов железа (МНКЖ) с ДЭТК. В качестве конкурентного ингибитора NOS используют N ω -нитро-L-аргинин в дозе 250 мг/кг. Регистрацию сигнала ЭПР образцов тканей проводят на радиоспектрометре при 77 К в X-диапазоне (мощность сверхвысокой частоты составляет 5 мВт и

амплитуда модуляции магнитного поля 0,5 мТ). Для количественной оценки содержания МНКЖ–ДЭТК, присутствующих в тканях (тем самым уровня NO, включенного в эти комплексы), сигналы ЭПР сопоставляют с сигналами тех же комплексов с известной концентрацией, синтезированных в растворе диметилсульфоксида.

ЭПР изучается продукция NO в организме при различных типах адаптации. Адаптация к стрессу вызывает генерализованное увеличение синтеза NO по его связыванию со специфической «ловушкой». Количество таких комплексов увеличивается в сердце, печени, почках, селезенке, тонкой кишке. Тем же ЭПР-методом показано, что стимулирующее действие на синтез NO в различных органах оказывает адаптация к физической нагрузке. В сердечно-сосудистой системе возрастание синтеза NO при этом типе адаптации выявляется по усилению эндотелийзависимых вазодилаторных реакций и экспрессии гена эндотелиальной NOS. При адаптации к стрессу и к физической нагрузке увеличивается как базальный, так и стимулированный синтез NO.

В последнее время разработан метод, позволяющий выявлять депо NO, сформировавшиеся в стенках кровеносных сосудов [12]. Такие депо образуются в результате повышения уровня NO в организме вследствие усиления синтеза эндогенного газа и введения экзогенных донаторов NO. У животных блокаду NOS производят путем инъекции невазоактивной дозы ингибитора активности фермента N ω -нитро-L-аргинина. В качестве донора NO используют динитрозильный комплекс железа с цистеином, а определение функционального состояния эндотелия и объема депо NO осуществляют на изолированной аорте. Для измерения величины NO препарат инкубируют с N ω -нитро-L-аргинином, после чего в камеру добавляют диэтилдитиокарбомат и оценивают величину вызванного им расслабления.

Этими методами показано, что депонирование NO в стенке сосудов начинается при любом повышении уровня NO в организме. В сосудах NO депонируется главным образом в эндотелии и очень слабо – в прилегающих к нему участках гладкой мышцы. Оценку NO-деактивирующей способности полиморфноядерных лейкоцитов проводят по измерению степени повышения уровня циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в клетках.

Электрохимические методы определения NO. Электрохимические методы обладают огромным потенциалом, потому что они простые, эффективные и могут быть использованы для определения NO in vivo. В связи с этим к этим методам сейчас проявляется очень большой интерес со стороны исследователей. Все датчики по определению NO можно разделить на три категории, основанные:

- на прямом окислении NO с использованием газопроницаемой или ионной мембраны;
- окислении NO на электродах, покрытых электрополимерной пленкой такого мономера, как металлопорфирин, металлофтилоционин или о-аминобензальдегидэтилендиамин никеля;
- на электрохимическом восстановлении NO модифицированными электродами.

1.5 Образование оксида азота в клетке и его физиологическое действие

Оксид азота является внутри и межклеточным мессенджером и участвует в регуляции разнообразных метаболических реакций, обеспечивающих жизнеспособность и функциональную активность клеток и всего организма в целом. Благодаря наличию неспаренного электрона на 2π орбитали, оксид азота проявляет высокую реакционную способность. NO хорошо растворим в воде и липидах, имеет наиболее высокий по сравнению с другими молекулами коэффициент диффузии, легко и беспрепятственно проникает через клеточные мембраны. Время жизни оксида азота составляет ~6–10 с, после чего он превращается в нитраты и нитриты при участии кислорода и воды. Радиус действия NO в тканях не превышает 500 мкм. Суточная продукция NO одним только эндотелием составляет 1,7 ммоль, а базальная концентрация газа в плазме приближается к 3 нмоль (уровень NO для клеток эндотелия оценивается в 4 пмоль/мин на 1 мг белка). Однако при определенных условиях оксид азота способствует развитию патологических процессов и возникновению ряда серьезных заболеваний. Двойное действие оксида азота реализуется в зависимости от его концентрации, времени воздействия и условий обмена в различных типах клеток и тканей организма (рис. 11.7).

NO вырабатывается различными типами клеток организма (эндотелиоцитами, эпителиоцитами, мезангиоцитами, миоцитами, лимфоцитами, нейтрофилами, тромбоцитами, макрофагами, фибробластами, нейронами, гепатоцитами, тучными и другими клетками).

Система оксида азота (NO) у человека обладает широким спектром биорегуляторного действия. Сейчас трудно назвать функцию организма, в регуляции которой NO не принимал бы участия. Он является уникальным медиатором межклеточного взаимодействия, участвующим в поддержке гомеостатических параметров организма в формировании базального тонуса сосудов, улучшения реологических свойств крови путем регуляции процессов агрегации ее форменных элементов, стабилизации проницаемости сосудистой стенки, обладает свободнорадикальными свойствами [6].

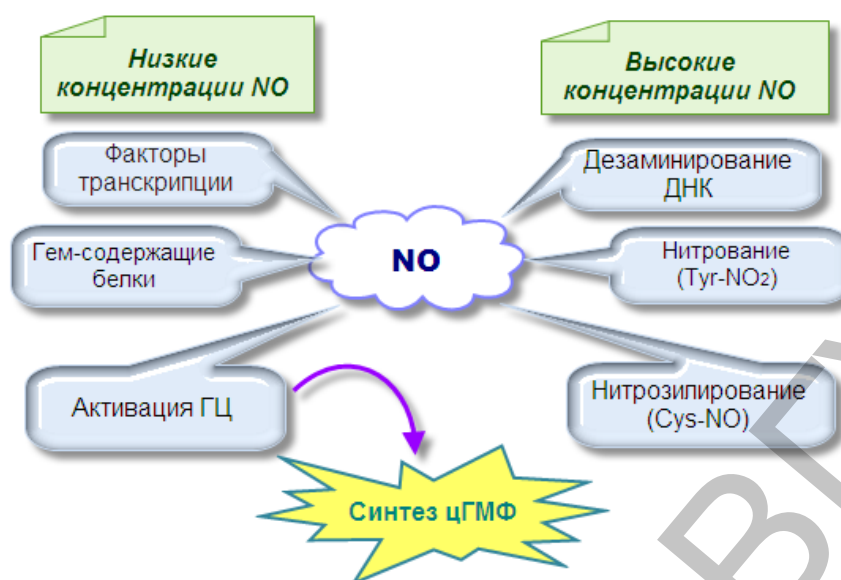


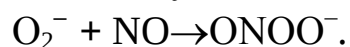
Рис. 11.7. Схема, иллюстрирующая функциональную активность оксида азота.

Оказалось, что оксид азота в качестве необходимого компонента участвует в работе желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы, функционировании секреторных клеток и тканей, в частности в выработке инсулина, в работе органов дыхания, жизнедеятельности кожного покрова и болевой реакции, в качестве ингибирующего фактора регулирует тромбообразование и адгезию тромбоцитов на поверхности сосудов. Важным звеном в регуляции работы многих внутренних органов вегетативной нервной системой является генерация NO в нервных окончаниях, иннервирующих органы, в частности органы желудочно-кишечного тракта. Особый интерес вызвал факт функционирования этого агента в работе репродуктивной системы животных и человека.

В центральной нервной системе оксид азота обеспечивает выделение нейромедиаторов, участвует в синаптической передаче и формировании длительно функционирующих связей между нейронами – постсинаптической потенциации, лежащей в основе памяти, обучения, наконец, творческой деятельности человека.

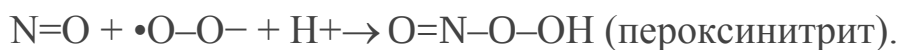
1.6. Пероксинитрит и его значение. Цитотоксическое действие NO

В процессе синтеза NO из L-аргинина в эквимоллярных концентрациях образуется NO и O_2^- . В связи с тем, что скорость реакции взаимодействия монооксида азота с супероксид-анионом намного выше, чем с супероксидсмутазой, то реакция идет в следующем направлении:

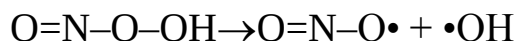


Образовавшийся в нормальных условиях пероксинитрит, по существу, обладает теми же свойствами, что и NO. При низких концентра-

циях ONOO^- способен вызывать дилатацию сосуда, снижать агрегацию тромбоцитов, экспрессию адгезивных молекул, оказывать цитопротективное действие и фактически является донором NO. Повышение уровня NO и свободных радикалов создает условия для гиперпродукции пероксинитрита ONOO^- и ведет к значительному увеличению его локальной концентрации в сосудистой стенке.



Существенный вклад в цитотоксическое действие пероксинитрита вносит OH-радикал.



Образование пероксинитрита и радикала гидроксила приводит к повреждению клеток. При высоких концентрациях ONOO^- очень токсичен, индуцирует апоптоз, нарушает функционирование системы простациклин-синтазы (блокируя синтез простациклина и усиливая синтез тромбоксана), вызывает фрагментирование белков за счет нитрирования аминокислот и липопротеинов, индуцирует окисление липопротеинов низкой плотности. Обратимое угнетение тканевого дыхания под влиянием NO под действием ONOO^- становится необратимым [13].

Благоприятные условия для синтеза ONOO^- создаются при недостатке тетрагидроптерина – кофактора, присутствующего в оксидазном домене NOS-3. В случае его недостатка нарушается «сцепка» между окислением кислорода и окислением аргинина. Результат этого – окисление воды до перекиси водорода при низких концентрациях тетрагидробиоптерина, синтез NO при высоких количествах кофактора и образование параллельных продуктов (H_2O_2 и NO) при средних его концентрациях.

При повышенной генерации NO, которое обнаруживается при разнообразных патологических процессах в гладкой мускулатуре сосудов, миокарде, нервной ткани и тканях секреторных органов, действие оксида азота приводит к трудно поправимым отрицательным последствиям. Так, например, усиленный синтез NO в сосудах при бактериальной инфекции организма может заканчиваться эндосептическим шоком. При этом резкое снижение периферического сопротивления кровеносных сосудов обусловлено значительным расслаблением их гладкомышечных клеток оксидом азота, который, по существу, и является причиной быстрого необратимого снижения кровяного давления. Другой пример: при гипоксии нейронов, вызванной повреждением кровеносных сосудов, наблюдается усиленная активация в них синтеза NO, причем NO может оказывать цитотоксическое действие на соседние нейроны. В результате развивается мозговой инсульт.

Таким образом, оксид азота как активный биологический агент может оказывать как положительное (регуляторное) действие, так и отрицательное.

Чрезмерному накоплению монооксида азота в условиях активации индуцируемой NO-синтазы препятствует инактивация фактора транскрипции NF-κB путем стабилизации ингибиторной субъединицы IκB в результате ее фосфорилирования. В итоге нарушается способность NF-κB связываться с промоторным участком гена индуцируемой NO-синтазы [14]. Таким образом, эффекты монооксида азота могут существенно различаться в зависимости от характера активности NO-синтазы, скорости образования пероксинитрита, состояния «мишеней» NO.

2. Эндотелины

В 1988 г. японский исследователь М. Янагасава с коллегами в журнале «Nature» опубликовали статью о новом эндотелиальном пептиде, активно сокращающем сосудистые клетки.

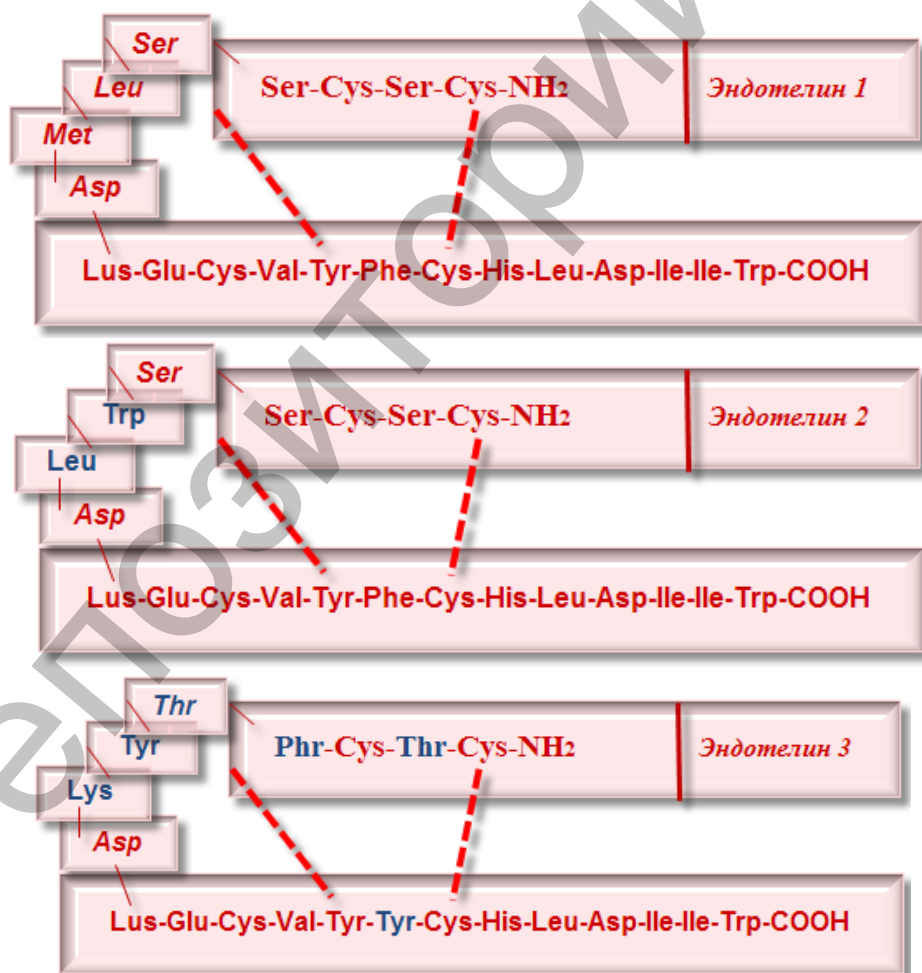


Рис. 11.8. Строение изопептидов: эндотелина 1, 2, 3. Выделенные аминокислотные остатки в структуре ET-2 и ET-3 отличаются от ET-1.

Открытый фактор сразу стал предметом интенсивного изучения. Этот пептид, названный эндотелином, – сегодня один из самых популярных в списке биоактивных регуляторов. Только за последние два года ему посвящено более 2,5 тыс. публикаций. Такой интерес связан с тем, что, во-первых, эндотелин – вещество с наиболее мощной сосудосуживающей активностью (изменения артериального давления вызываются дозами в 10^{-12} – 10^{-14} моля, а во-вторых, пептид образуется в самом большом по массе эндокринном органе – эндотелии.

Эндотелин – крупная полипептидная молекула: 21 аминокислотный остаток, бициклическая структура, связанная сульфгидрильными мостиками. Помимо эндотелина-1 (ЕТ-1), известны две его изоформы – эндотелины 2 и 3, отличающиеся друг от друга некоторыми вариациями в аминокислотной последовательности (рис. 11.8).

Синтез эндотелина стимулируют тромбин, адреналин, ангиотензин, интерлейкин, клеточные ростовые факторы и др. Создается впечатление высокой сопряженности пептида с регуляторами различного происхождения. В большинстве случаев эндотелин секретируется из эндотелия «внутрь», к мышечным клеткам, где расположены чувствительные к нему ЕТА-рецепторы. Меньшая часть синтезируемого пептида, взаимодействуя с рецепторами ЕТВ-типа, расположенными на эндотелиоцитах, стимулирует синтез NO.

Таким образом, один и тот же фактор регулирует две противоположные сосудистые реакции (сокращение и расслабление), реализуемые различными химическими механизмами (рис. 11.9).

Эндотелин рассматривается как маркер и «предсказатель» многих сосудистых патологий.

Эндотелин (ЕТ-1) образуется в результате ограниченного протеолиза из «большого эндотелина» («Big endothelin» (В-ЕТ)), молекулы, включающей 38 аминокислотных остатков под влиянием эндотелин-превращающего фермента (endothelin-converting enzyme, ECE) (рис. 11.10).

Биосинтез указанных эндотелинов происходит при гидролизе соответствующих «изопредшественников»: В-ЕТ-1, -2 и -3 служат основными субстратами для ECE. В препаратах эндотелиальных клеток человека из пупочной вены соотношение гидролиза этих предшественников составляет, соответственно, 40:2,5:1.

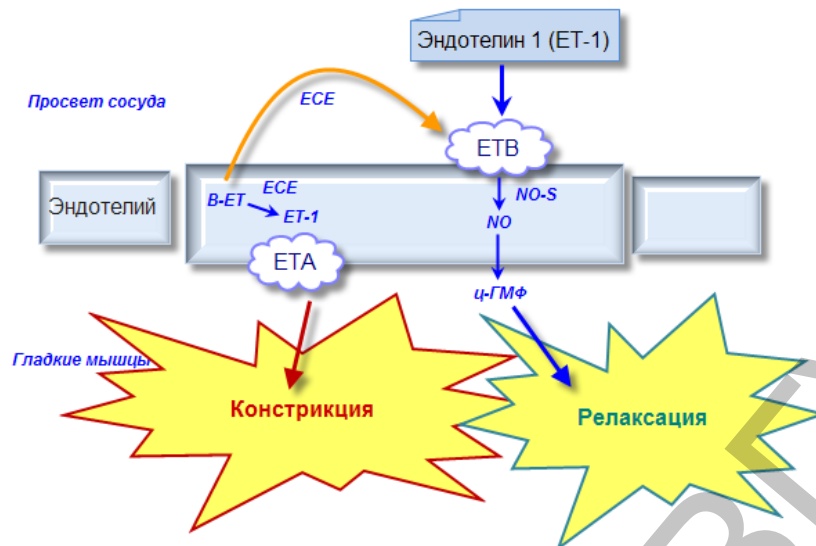


Рис. 11.9. Двойной эффект эндотелия. ECE — эндотелин-превращающий фермент, ETB и ETA — подтипы рецепторов эндотелина, B-ET — большой предшественник эндотелина, NOS — NO-синтаза.

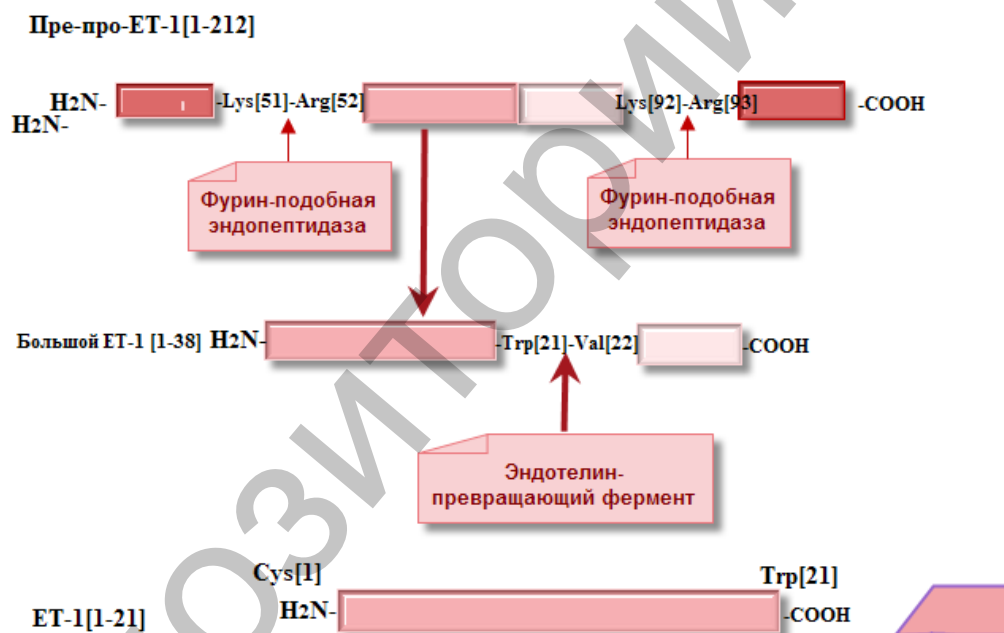


Рис. 11.10. Процессинг и образование «зрелой» формы эндотелина 1. Показаны места гидролиза аминокислотных последовательностей под влиянием эндотелин-процессирующих пептидаз.

ECE относится к группе мембраносвязанных металлопротеиназ, участвующих в процессинге многих пептидных гормонов и нейропептидов. По ряду свойств ECE сходен с одной из основных Zn^{2+} -содержащих металлопротеиназ — нейтральной эндопептидазой 24.11 (неприлизином). На основе сравнения ECE с другими металлопротеиназами предпринята попытка моделирования активного центра ECE. Выявлена локализация ECE

в большинстве тканей млекопитающих: в эндотелии сосудов легких, сердца, почек, мозга, плаценты, а также в поджелудочной железе и надпочечниках. Впервые гомогенный белок ЕСЕ был получен из микросом легких крысы. Обнаружено, что фермент находится как на клеточной поверхности эндотелиальных клеток сосудов, так и внутри эндотелиальных везикул; при этом возможна рециклизация его с поверхности внутрь эндотелия. Иммунофлюоресцентная микроскопия демонстрирует, что изоформа ЕСЕ-1а расположена преимущественно на поверхности клеток, тогда как отличающийся от него ЕСЕ-1b – внутриклеточно, будучи колокализированным с транс-Гольджи маркерным белком.

Показано, что ET-1 способен подавлять экспрессию мРНК ЕСЕ-1 в эндотелиальных клетках легких, демонстрируя возможность обратной регуляции процесса биогенеза ЕСЕ-1. Более детальный анализ выявил, что ЕСЕ-1, в противоположность неприлизину, обладал минимальной активностью в отношении небольших олигопептидов (лей-энкефалин), однако эффективно расщеплял нейротензин, вещество Р, брадикинин и бета-цепь инсулина. Подтипы рецепторов эндотелина 1 представлены в табл. 11.1.

Таблица 11.1 – Подтипы рецепторов эндотелина 1: локализация, физиологические эффекты и участие вторичных посредников

РЕЦЕПТОР	ТКАНЬ	ЭФФЕКТ	ПОСРЕДНИКИ
ETA	гладкая мышца сосуда	констрикция	фосфолипаза С
ETB2	гладкая мышца сосуда	митогенез (пролиферация)	инозитолфосфат, диаглицерол
ETA	эндотелий	высвобождение NO, PGI ₂ , EDGF	фосфолипазы C, D, A ₂
ETB1	эндотелий	высвобождение NO и других факторов	аденилат-гуанилатциклазы

Взаимодействие каждого подтипа рецептора с лигандом запускает свойственный ему каскад сигнальных реакций с вовлечением различных систем вторичных посредников. ET-1 через ETA рецепторы включает цепь процессов, среди которых активированная G-белками фосфатидилинозитол-специфичная фосфолипаза С играет, по-видимому, основную роль. Оба вторичных посредника – инозитол-1,3,5-трифосфат и диаглицерол – ответственны за реализацию трансмембранного сигнала. Последующие реакции приводят к изменению концентрации Ca²⁺ в цитозоле и его пассажу через соответствующие каналы мембраны (рис. 11.11). Эффекты ET-2, опо-

связанные ЕТА рецепторами, оказываются количественно сходными – в противоположность действию изопептида ЕТ-3.

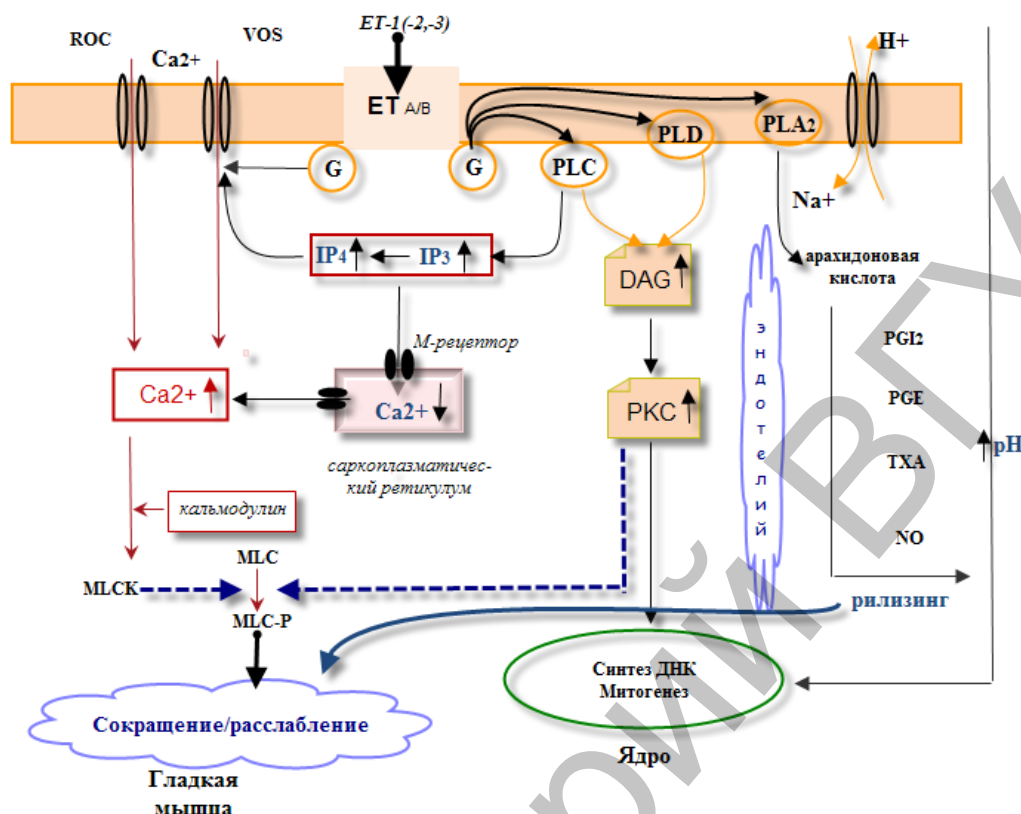


Рис. 11.11. Система трансдукторных процессов, опосредующих физиологические эффекты эндотелинов (по Rubanyi and Polokoff, 1994, модифицировано).

ЕТ-1 (-2,-3) – эндотелин 1 (2, 3); ЕТА/В – рецепторы эндотелина; ROC – рецептор-зависимый Ca²⁺ канал; VOC – низковольтный Ca²⁺ канал; PLC (PLD, PLA2) – фосфолипазы (соответственно -C,-D,-A2); IP₃ – 1,4,5-инозитолтрифосфат; IP₄ – 1,3,4,5-инозитолтетрафосфат; DAG – 1,2-диаглицерол; PKC – протеинкиназа C; PGE, PGI₂, TXA – простагландины арахидонового каскада; MLC – легкая цепь миозина (myosin light chain); MLCK – киназа легких цепей миозина.

В целом, многообразие функций ЕТ-1 как модулятора тонуса сосудов, клеточного роста, пролиферации, митогенеза, релизига гормонов из надпочечников и др. может быть объяснено наличием различных сигнальных (трансдукторных) механизмов.

Эти процессы связаны с активностью различных подтипов эндотелиновых рецепторов, включающими соответствующие эффекторные системы.

3. Простаглицлин

Простаглицлин (PGI₂) – впервые был обнаружен S. Bunting и др. (Bunting, 1976) и C. Pace-Asciak (Pace-Asciak, 1976) в виде его стабильного продукта, 6-кето-PGF₁альфа, образующегося из арахидоновой кислоты в аорте быка и желудке крысы. Бициклическая структура простаглицлина бы-

ла установлена R. Johnson и др. в 1976 г. Простациклины образуются в эндотелиальных клетках и подавляют агрегацию тромбоцитов, но в отличие от NO не влияют на их адгезию. Простациклин является сильным ингибитором агрегации тромбоцитов и вазодилатором, действующим почти на все типы гладкомышечных клеток.

Обе эти активности простациклина связаны с его способностью активировать аденилатциклазу через взаимодействие со специфическими рецепторами (IP типа). Кроме того, простациклин способен ингибировать всасывание ионов натрия в прямой почечный каналец и вызывать сокращение продольных гладких мышц тонкого кишечника.

Простациклин образуется из PGH₂ под действием фермента простациклин-синтазы. Метаболизм простациклина на первой стадии включает неферментативное превращение (2 мин при 37 °C) в неактивное соединение 6-кето-PGF₁альфа, которое является основным метаболитом простациклина в циркулирующей крови. Еще одним продуктом неферментативного превращения простациклина является 6-кето-PGE₁, соединение с ярко выраженной биологической активностью. Подобно простациклину, оно вызывает ингибирование агрегации тромбоцитов и является сильным вазодилатором. Основным метаболитом простациклина, обнаруживаемым в моче, является 2,3-динор-6-кето-PGF₁альфа, продукт бета-окисления 6-кето-PGF₁альфа.

Простациклин-синтетаза – фермент, под действием которого нестабильные простагландины превращаются в простациклин – мощный вазодилатор и ингибитор агрегации тромбоцитов. Простациклин-синтаза обнаружена в гладких мышцах сосудистых и несосудистых тканей и в различных «calcified tissue-forming» клетках крысы. Простациклин-синтаза, выделенная из аорты быка, представляет собой гемопротейд цитохром P-450 типа. В отличие от других простагландинов простациклин не образуется в ходе неферментативного разложения PG-эндопероксида. Однако в присутствии различных Fe(III)-протопорфиринов, а также неспецифических цитохром P-450 печени крысы и очищенной камфоры-5-монооксигеназы происходило образование заметных количеств стабильного продукта деградации простациклина, 6-кето-PGF₁альфа – 0,5–5% от суммарной радиоактивности.

Простациклин – это второй известный продукт эндотелиального происхождения, который может вызывать гиперполяризацию и расслабление сосудистой гладкой мышцы. Расслабление гладкомышечных клеток происходит благодаря увеличению внутриклеточной концентрации цАМФ. Кроме того, релаксирующий эффект простациклина может усиливаться оксидом азота. Это возможно благодаря тому, что оксид азота может действовать в качестве ингибитора фосфодиэстеразы – фермента, разрушающего

цАМФ. цАМФ также способен открывать АТФ-чувствительные калиевые каналы в мембране гладких миоцитов (K_{ATP}), в результате чего увеличивается выход ионов калия из клетки и возникает гиперполяризация.

В настоящее время имеется лекарственный препарат – аналог простаглицлина – илопрост. Илопрост (iloprost) – антиагрегантное средство, способное активно подавлять агрегацию, адгезию и активацию тромбоцитов. Препарат вызывает дилатацию артериол и венул, снижает повышенную сосудистую проницаемость, активирует фибринолиз, подавляет адгезию и миграцию лейкоцитов после повреждения эндотелия, уменьшает образование свободных радикалов кислорода.

4. Эндотелиальный гиперполяризующий фактор

В 1984 г. Болтон и др. впервые показали, что стимуляция эндотелия сосудов вызывает гиперполяризацию и расслабление гладкой мышцы мезентериальной артерии морской свинки [15]. В то же время эндотелиальный NO способен гиперполяризовать гладкую мышцу лишь в некоторых сосудах. Позже стало очевидным, что подобную гиперполяризацию вызывает и простаглицлин. Однако то обстоятельство, что в условиях блокады синтеза NO и простаглицлинов стимуляция эндотелия многих сосудов все же способна вызвать гиперполяризацию сосудистых гладких мышц, послужило основанием назвать это соединение неизвестной природы эндотелиальным фактором гиперполяризации (EDHF).

В соответствии с этим *NO, эйкозаноиды и эндотелиальный фактор гиперполяризации (EDHF) были идентифицированы как главные релаксирующие факторы эндотелиального происхождения*. Простаглицлин отвечает всем требованиям, предъявляемым к EDHF. Однако в большинстве случаев эндотелийзависимая гиперполяризация сосудистой гладкой мышцы является устойчивой к действию блокаторов синтеза простаглицлинов.

Высвобождающиеся из эндотелиоцитов ионы K^+ , продукты P-450 монооксигеназного пути (EET), пероксид водорода и др. субстанции способны вызывать гиперполяризацию подлежащих гладкомышечных клеток, активируя K_{ir} -каналы, Na^+/K^+ АТФ-азу и/или $ВК_{Ca}$ (кальцийактивируемые калиевые каналы большой проводимости), обнаруженные в их мембране. Образующийся под влиянием NO цГМФ в некоторых сосудах также способен их активировать.

Гиперполяризация мембраны эндотелиоцита, возникающая после открытия калиевых каналов, приводит к поступлению ионов кальция внутрь клетки и высвобождению вазодилаторных субстанций. В то же время увеличение проницаемости калиевых каналов, находящихся в мембране

гладкомышечной клетки, сопровождается уменьшением поступления в нее кальция. Это противоречие связано с тем, что в мембранах гладкомышечных клеток и эндотелиоцитов экспрессируются различные по свойствам кальциевые каналы. В эндотелиальных клетках преимущественно находятся нечувствительные к изменению мембранного потенциала кальциевые каналы [16]. Вызываемая выходом калия гиперполяризация мембран эндотелиоцитов приводит к увеличению электрического градиента, благодаря которому ионы Ca^{2+} через катионные каналы входят в клетку. Следовательно, в цитоплазме эндотелиоцита увеличивается концентрация Ca^{2+} , активируется синтез и высвобождение вазодилаторных метаболитов. В то же время гиперполяризация мембраны гладкомышечной клетки, вызванная увеличением проницаемости калиевых каналов, сопровождается закрытием потенциалзависимых Ca^{2+} каналов и развитием вазодилатации.

Таким образом, *благодаря экспрессии различных типов кальциевых каналов гиперполяризация эндотелиоцитов увеличивает вход Ca^{2+} внутрь клетки и активирует синтез и высвобождение вазодилаторных субстанций, а в гладкомышечных клетках – наоборот, уменьшает вход Ca^{2+} , что также приводит к расслаблению гладкой мышцы и расширению сосуда.*

Наблюдения, выполненные на интактных животных, подтвердили важную роль EDHF в регуляции диаметра маленьких сосудов *in vitro*. Кроме того, было показано, что, по крайней мере, в некоторых артериях NO может подавлять доступность и эффективность EDHF.

Таким образом, нарушение биодоступности NO, которое наблюдается при различных заболеваниях, выявляет действие EDHF. *Главная роль EDHF заключается в том, чтобы компенсировать ослабление влияния NO.*

К возможным веществам, действующим как *эндотелиальный гиперполяризующий фактор* или факторы (EDHF) и вызывающим гиперполяризацию гладкомышечных клеток (рис. 11.8), в настоящее время относят производные цитохром Р450 монооксигеназы – эпоксиэйкозотриеновые кислоты (EET), ионы калия, каннабиноиды, пероксид водорода и электрическое сопряжение эндотелиальных и гладкомышечных клеток при помощи миоэндотелиальных плотных контактов (gap junctions) (рис. 11.12) [17].

Эпоксиэйкозотриеновые кислоты (11–12 EET). EET-зависимый EDHF вносит вклад в развитие эндотелийзависимой вазодилатации, которая может обеспечить полное расслабление и является чувствительным к коктейлю харибдотоксин+апамин. Установлена роль эндотелиальной цитохром Р450 монооксигеназы в модуляции эндотелийзависимой гиперполяризации в коронарных сосудах различных видов животных.

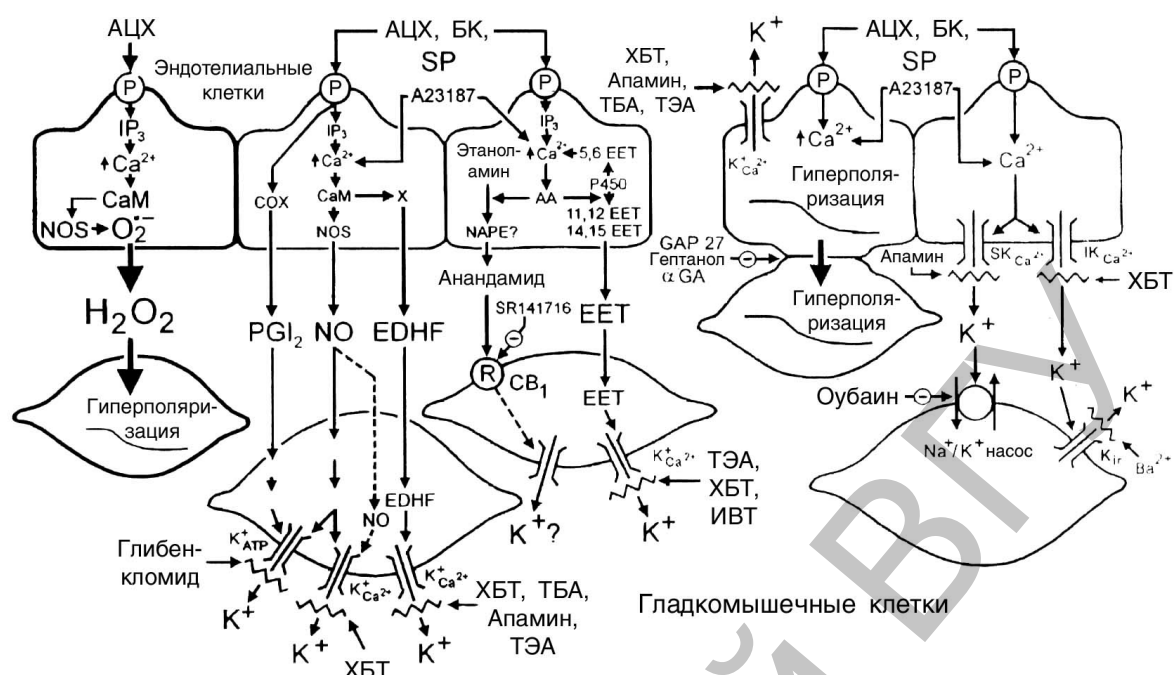


Рис. 11.12. Множественность механизмов эндотелийзависимой дилатации.

АЦХ-ацетилхолин, БК-брадикинин, SP-субстанция Р, активируя M_2 -холинорецепторы, B_2 -брадикининовые рецепторы, NK_1 -нейрокиновые рецепторы, а также вещества, которые увеличивают внутриклеточную концентрацию ионов кальция, такие, как ионофор А23187, приводят к высвобождению эндотелиального гиперполяризующего фактора. Кальмодулин (CaM), циклооксигеназа (COX), эпоксиэйкотетраеновая кислота (EET), инозитолтрифосфат (IP₃), гуанилатциклаза, N-ацилфосфатидил-этаноламин-NAPE, NOS – NO-синтаза, O_2^- – супероксиданион, простаглицин (PGI₂), P450 – монооксигеназа, P – рецептор. SR141716 – антагонист каннабиноидных рецепторов (CB₁), глибенкломид-селективный ингибитор АТФ-чувствительных калиевых каналов (K_{ATP}^+). Тетраэтиламоний (ТЭА) и тетрабутиламоний (ТБА) – при использовании в высоких концентрациях являются неспецифическими ингибиторами калиевых каналов ($>5\text{mM}$), в то время как при низких (1–3mM) эти вещества избирательно действуют на кальцийактивируемые калиевые каналы ($BK_{Ca^{2+}}^+$). Ибериотоксин (ИБТ) – специфический ингибитор кальцийзависимых калиевых каналов большой проводимости. Харриботоксин (ХБТ) – ингибитор кальцийзависимых калиевых каналов большой и средней проводимости ($IK_{Ca^{2+}}^+$) и потенциалзависимых калиевых каналов. Апамин – специфический блокатор кальцийзависимых калиевых каналов малой проводимости ($SK_{Ca^{2+}}^+$). Барий (Ba^{2+}) в микромолярных концентрациях является специфическим ингибитором калиевых каналов (Kir). GAP – пептид, состоящий из 11 аминокислот, обладающий последовательностью гомологичной второй части внеклеточной петли коннексина, гептанол – вещество нарушающее проводимость в плотном соединении (gap-junction) [18].

Первым крупным достижением было осуществление синтеза и выяснение свойств специфического антагониста эпоксиэйкозатриеновой кислоты 14–15-эпоксиэкозо-5Z-моноеновой кислоты (14–15-EEZE) и его метилсульфонимидного производного. Этот антагонист ингибировал эндотелий-

зависимое расслабление и устойчивую к ингибиторам NO-синтазы и циклооксигеназы гиперполяризацию. Мишень (рецептор, канал или фермент) действия 14–15-EEZE все еще неизвестна (эндотелий или гладкомышечная клетка). Более того, уже выявлено влияние 14–15-EEZE на SK_{Ca} и IK_{Ca}-каналы эндотелиоцитов. Таким образом, это соединение может стать инструментом для точной идентификации роли EET в EDHF-опосредуемых ответах.

Тот факт, что в условиях ингибирования NO-синтазы и циклооксигеназы наблюдается подавляемое блокатором цитохром P450 монооксигеназы ацетилхолинзависимое расслабление сосудов *m. cremaster* хомьчка, позволяет предположить, что в данном сосудистом ложе имеет место высвобождение EET. Подобно этому, в артериолах *m. gracilis* самок мышей с отсутствующими генами NO-синтазы shear stress также вызывает высвобождение продукта цитохрома P450 эпноксигеназы. Этот факт подтверждается тем, что циклическое растяжение и напряжение сдвига на эндотелиоцитах (shear stress) увеличивают экспрессию и активацию цитохром P450 2C в эндотелиальных клетках. В исследованиях, проведенных с использованием коронарных артерий различных видов животных, было показано, что в этих сосудах в роли EDHF выступает EETs. Они вызывают гиперполяризацию гладкомышечных клеток благодаря активации калиевых каналов большой проводимости, расположенных в их мембране [19]. Дополнительная роль EET заключается в том, что он вызывает гиперполяризацию тромбоцитов, а в мозговом кровообращении производное астроцитов 8,9-EET оказывает ангиогенный эффект и способствует пролиферации эндотелиоцитов.

Ионы K⁺. Впервые на препаратах мезентериальной и печеночной артерий было показано, что через эндотелиальные калиевые каналы ионы калия выходят и накапливаются во внеклеточном пространстве, тем самым вызывая гиперполяризацию окружающих гладких мышц. Этот механизм также наблюдается при EDHF-опосредуемом ответе печеночной артерии крысы и людей, так же, как и в маленьких коронарных артериях свиньи. В гладкомышечных клетках артерий крысы имеются две мишени, на которые действуют ионы K⁺, высвободившиеся из эндотелиоцитов, Kir-каналы и Na⁺, K⁺ АТФ-аза. Это влияние ионов K⁺ на мембранный потенциал вызывает гиперполяризацию и расслабление гладкомышечных клеток. Подобный механизм может объяснить тот факт, что *ионы калия действуют как EDHF и в деполяризованных тканях устраняют EDHF-опосредуемый ответ.*

Подобно натрию, калий является вазоактивным ионом. Например, когда раствор хлористого калия вводят в артерию, то это сопровождается увеличением кровотока в области кровоснабжения этой артерией. Калий

является главным внутриклеточным катионом и, как уже было показано, теряется клетками скелетной мышцы во время физической нагрузки, затем пересекает внеклеточное пространство и вызывает локальную дилатацию артериол. Если калиевые ионы играют роль как локальный метаболический регулятор кровотока в скелетной мышце, то, вероятно, они также могут быть вовлечены в регуляцию кровотока. В 1936 году было продемонстрировано, что ионы калия расслабляют изолированные сосудистые полоски. Это было подтверждено и более поздними исследованиями, особенно в работах лаборатории Detar. Вызываемая ионами калия вазодилатация возникает в результате гиперполяризации сосудистых гладкомышечных клеток, развивающейся вследствие стимуляции электрогенного Na, K-насоса и/или активации внутренне выпрямляющих K_{ir}-калиевых каналов. *В скелетных мышцах и мозге увеличение калием кровотока является необходимым для обеспечения возрастания метаболической потребности ткани.* Ионы калия также высвобождаются эндотелиальными клетками в ответ на действие на них нейрогуморальных медиаторов и физических сил (подобно shear stress) и, будучи компонентом EDHF опосредуемого ответа, вносят вклад в эндотелийзависимое расслабление. Увеличение потребления калия с пищей может приводить к уменьшению артериального давления у пациентов с нормальным артериальным давлением и у гипертоников. Однако, в отличие от ограничения NaCl, ответ на добавление калия к пище наступает медленно, в течение 4-х недель. Применение подобной добавки приводит к уменьшению потребности в гипотензивных средствах.

Пероксид водорода. Как оказалось H₂O₂ является EDHF не только в кровеносных сосудах мыши, но также и в коронарных сосудах собаки, и в мезентериальных артериях человека. Необходимо еще определить, что вызываемая H₂O₂ эндотелийзависимая гиперполяризация (релаксация) в равной степени чувствительна к комбинации харибдотоксина+апамина, а также одного ибериотоксина или его сочетания с апамином.

В различных сообщениях пероксид водорода представлен как вазоконстриктор либо вазодилататор, либо как вещество, сочетающее в себе оба свойства. Кроме того, был показан различный эффект перекиси водорода эндогенного и экзогенного происхождения. В большинстве сообщений, касающихся влияния перекиси водорода на тонус коронарных сосудов, указывается, что пероксид водорода расслабляет артериоларную и артериальную сосудистую гладкую мышцу. Было показано, что пероксид водорода является EDHF и медиатором потониндуцируемой дилатации. Считают, что *эндотелий продуцирует пероксид водорода как вещество, расслабляющее сосудистую гладкую мышцу.* Также было установлено, что перок-

сид водорода опосредует реактивную гиперемия, а в сочетании с монооксидом азота и аденозином оказывает влияние на ауторегуляцию коронарного потока. P.A. Rogers et. al. (2006) показали, что пероксид водорода увеличивает коронарный кровоток как *in vivo*, так и *in vitro*, оказывает свое влияние на тонус гладкой мышцы посредством активации чувствительных к 4-аминопиридину калиевых каналов. Одним из механизмов действия перекиси водорода на сократительную активность гладкой мышцы является окисление редокс-чувствительных белковых SH-групп [20].

Анандамид. Рэндал и соавторы в 1996 году предположили, что EDHF представляет собой производное арахидоновой кислоты анандамид, который взаимодействует с каннабиноидными рецепторами, расположенными на гладкомышечных клетках. Применение блокаторов каннабиноидных рецепторов предупреждает эффект эндотелиального фактора гиперполяризации. Кроме того, его эффект уменьшался при увеличении внеклеточной концентрации ионов калия, препятствующей появлению гиперполяризации. Однако в этой работе не было прямо продемонстрировано, что анандамид вызывает гиперполяризацию гладкомышечных клеток вследствие активации калиевых каналов [21].

Межклеточные контакты. Возможность прямого внутриклеточного распространения широко

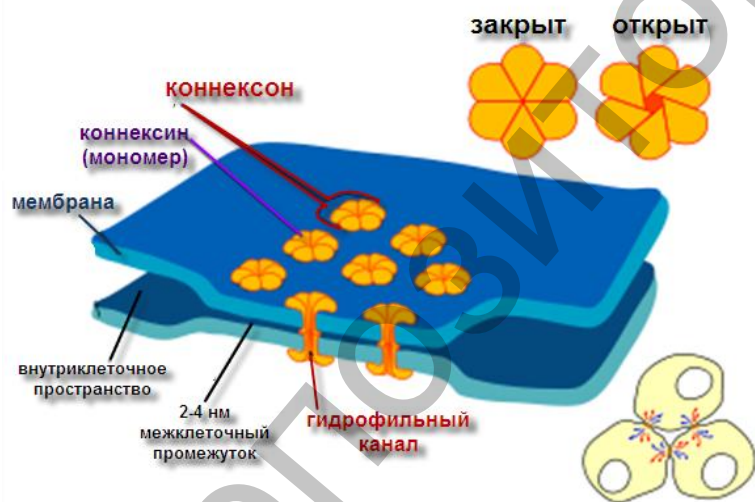


Рис. 11.13. Структура плотных контактов.

обсуждается в литературе, а также служит подтверждением существования миоэндотелиального плотного контакта (gap junctions). Более того, пептидный ингибитор плотных контактов подавлял, но не устранял действие EDHF на гладкую мышцу. Благодаря использованию ингибиторов появились доказательства во-

влечения миоэндотелиальных плотных контактов почечных сосудов в механизм действия EDHF *in vivo*. Это исследование показало, что пептидные ингибиторы не только блокируют вызываемое ацетилхолином, обусловленное EDHF увеличение кровотока, но также снижают базальный кровоток в этом сосудистом ложе.

В последние несколько лет появились данные, касающиеся роли межклеточных контактов в распространении гиперполяризации. Плотные

контакты между эндотелиальными клетками облегчают продольное распространение вызванных агонистами как гиперполяризации, так и расслабления, в то время как плотные контакты между гладкомышечными клетками координируют базальный тонус артериоларных сегментов. Эти соединения, характеризующиеся пенталаминарной структурой, находятся между прилегающими к эндотелию гладкомышечными клетками, встречаются в кровеносных сосудах (мезентериальная артерия крысы), в которых показано эндотелийзависимое расслабление (гиперполяризация), устойчивое к комбинации ингибиторов циклооксигеназы и NO-синтазы (рис. 11.13).

Напротив, в кровеносных сосудах (бедренная артерия крысы), в которых подобный ответ не наблюдается, миоэндотелиальные плотные контакты отсутствуют.

Физиологическая и патофизиологическая роль EDHF-опосредуемых ответов. Подводя итог приведенным в данном разделе фактам, можно заключить, что не так давно о природе EDHF существовало столько гипотез, сколько ученых работали в этом направлении. В настоящее время обнаружен универсальный механизм, который позволяет объяснить большинство ответов, являющихся следствием действия EDHF и наблюдающихся во всех изучаемых кровеносных сосудах и видах животных. *Описан феномен эндотелийзависимой гиперполяризации, согласно которому, во-первых, в результате увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в эндотелиоцитах активируются SK_{Ca} и/или IK_{Ca} каналы; во-вторых, в результате этого высвобождаются эндотелиальные вазорелаксирующие субстанции, вызывающие гиперполяризацию гладкомышечных клеток. Через миоэндотелиальные плотные контакты гиперполяризация электрохимически распространяется на прилегающие гладкомышечные клетки, которые формируют функциональный синцитий. Кроме того, выходящие через открытые SK_{Ca} и IK_{Ca} каналы эндотелиоцитов ионы K^+ могут вызывать гиперполяризацию прилегающих гладкомышечных клеток артериальных сосудов, активируя K_{ir} -каналы и/или Na^+ , K^+ АТФ-азу. Эти механизмы могут иметь место одновременно, последовательно и действовать энергично. Соотношение этих механизмов будет зависеть от разных условий, которые включают в себя состояние гладкомышечных клеток, плотность миоэндотелиальных контактов, а также уровень экспрессии изоформ цитохромом P450 монооксигеназы, K_{ir} и Na^+ , K^+ АТФ-азы.*

5. Калиевые каналы и физиология клетки

Изменение активности калиевых каналов представляет один из фундаментальных механизмов, которые регулирует тонус сосудов. *Активация калиевых каналов в гладкомышечных клетках приводит к развитию гиперполяризации мембраны клетки, закрытию потенциалзависимых кальциевых каналов, что в конечном итоге приводит к значительному уменьшению внутриклеточной концентрации ионов кальция и расслаблению гладкомышечных клеток стенки сосудов* [22]. Изменение мембранного потенциала всего на несколько милливольт сопровождается существенным изменением тонуса сосудов. Активация калиевых каналов происходит при действии некоторых рецептор-опосредуемых агонистов, вторичных посредников и гипоксии. Эндотелийгиперполяризующий фактор вызывают гиперполяризацию и расслабление сосудистой гладкой мышцы посредством активации калиевых каналов. Кроме калиевых каналов, расположенных в гладкомышечных клетках, они присутствуют в мембране эндотелиоцитов. Гиперполяризация эндотелиоцитов сопровождается мобилизацией кальция и может быть важным механизмом в высвобождении NO, простагличина и EDHF (эндотелиальный фактор гиперполяризации) [23].

В начале 1980-х годов было обнаружено, что фармакологические вещества могут «открывать» или «закрывать» мембранные калиевые каналы. *Сахароснижающий препарат глибенкламид и антиаритмик III класса амиодаон оказались блокаторами («закрывателями») калиевых каналов*. Вскоре был получен *первый активатор калиевых каналов – никорандил, затем другие активаторы: бимакалим, кромакалим, пинацидил и др.* Было обнаружено, что активатором («открывателем») калиевых каналов является вазодилататор миноксидил. Вазодилататорными и гипотензивными свойствами обладают в той или другой степени все указанные активаторы калиевых каналов. Они оказывают также антиангинальное-кардиопротекторное действие.

5.1. Классификация калиевых каналов и их локализация в клетках различных органов

Калиевые каналы классифицированы на четыре подгруппы (по данным Nomenclature Compendium – International Union of Pharmacology): потенциалзависимые калиевые каналы (K_v), кальцийактивируемые калиевые каналы (K_{Ca}), двухпоровые калиевые каналы (K_{2P}), калиевые каналы внутреннего выпрямления (K_{ir}) семейства [24].

Эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудистой стенки содержат уникальную популяцию K^+ каналов, кодируемых пятью семействами генов. Это inwardly rectifying K_{ir} каналы (калиевые каналы внутреннего выпрямления), потенциалзависимые K^+ каналы и три типа активируемых

Ca^{2+} калиевых каналов (SK_{Ca} – активируемые кальцием калиевые каналы малой проводимости, IK_{Ca} – активируемые кальцием калиевые каналы средней проводимости, BK_{Ca} – активируемые кальцием калиевые каналы большой проводимости). Кроме того, выделяют АТФ-чувствительные калиевые каналы ($\text{K}_{\text{АТФ}}$) [25]. Экспрессия данных семейств генов в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках изменяется во время сердечно-сосудистых заболеваний, тем самым приводя к изменению состава калиевых каналов в мембране и нарушению вазодилатации.

Сосудистый тонус обеспечивается сократительной активностью гладкомышечных клеток, находящихся в стенках сосудов, и играет важную роль в регуляции кровяного давления и распределении кровяного потока в тканях и органах. Регуляция сократительной активности гладкомышечных клеток кровеносных сосудов в системном кровообращении зависит от комплексного взаимодействия вазоконстрикторных и вазодилататорных стимулов из циркулирующих в кровяном русле гормонов, нейромедиаторов, эндотелиального фактора гиперполяризации, а также кровяного давления. Все эти сигналы обрабатываются сосудистыми гладкомышечными клетками, определяя активность их сократительного аппарата, а следовательно – диаметр и гидравлическое сопротивление кровеносных сосудов. Ионные каналы играют важную роль в этом процессе. Подобно всем гладкомышечным клеткам, сосудистая гладкомышечная клетка в качестве пускового механизма для сокращения использует ионы кальция. Кроме того, движение ионов через ионные каналы определяет, в большей степени, мембранный потенциал. Таким образом, в связи с тем, что калиевые каналы имеют важное значение как в создании, так и в поддержании мембранного потенциала, они играют важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов.

5.2. Особенности эндотелиальных и гладкомышечных клеток

Существует несколько уникальных особенностей, которые отличают эндотелиоциты и гладкомышечные клетки от кардиомиоцитов и нейронов. Во-первых, в их мембране отсутствуют потенциалзависимые натриевые каналы, обеспечивающие вход ионов натрия в клетку, деполяризация эндотелиальных клеток возникает благодаря подавлению выхода калия из клетки. Во-вторых, ионы Ca^{2+} входят в эндотелиоцит через кальциевые каналы, нечувствительные к изменению разности потенциалов. В-третьих, мембранный потенциал покоя в эндотелиальных и гладкомышечных клетках находится в пределах от -35 до -60 мВ, что значительно меньше, чем в кардиомиоцитах и нейронах (от -70 до -90 мВ). В-четвертых, благодаря наличию плотных соединений (gap junction) эндотелиоциты и гладкомы-

шечные клетки электрически сопряжены между собой. Это позволяет ионам проникать в соседние клетки и, таким образом, координировать электрические события и уровень возбудимости в пределах сосудистой стенки.

Сосудистый тонус мелких артерий и, таким образом, кровоснабжение различных органов регулируется при участии АТФ-чувствительных калиевых каналов [26]. При отсутствии K_{ATP} -каналов в гладкомышечных клетках и кардиомиоцитах повышается чувствительность коронарных сосудов к эргоновину (феномен Принцметала) и развивается электрическая нестабильность миокарда (фибрилляция сердца при повторных физических нагрузках) [27]. В. Malester et. al. (2007) исследовали свойства коронарных сосудов мыши, у которых отсутствовали K_{ATP} -каналы только в эндотелиоцитах. Ими было установлено, что в этих условиях значительно увеличивается синтез и высвобождение эндотелина I, тонус сосудов сердца и снижается коронарный кровоток.

Калиевые каналы вовлечены в управление пролиферацией клетки, апоптоз, синтеза NO, в развитие опухолей и секреции инсулина, принимают участие в транспорте электролитов в эпителии, например, в канальцах почки или в ободочной кишке млекопитающих, регулируют сокращение миометрия.

5.3. Метод локальной фиксации потенциала, patch-clamp (англ. *patch* – фрагмент, *clamp* здесь – фиксация) – электрофизиологическая методика для изучения свойств ионных каналов (рис. 11.14). Сущность метода заключается в том, что с помощью специальных электронных систем в процессе опыта изменяют и фиксируют на определенном уровне мембранный потенциал. При этом измеряют величину ионного тока, протекающего через мембрану. Если разность потенциалов постоянна, то в соответствии с законом Ома величина тока пропорциональна проводимости ионных каналов. В ответ на ступенчатую деполяризацию открываются те или иные каналы, соответствующие ионы входят в клетку по электрохимическому градиенту, т.е. возникает ионный ток, который деполяризует клетку. Это изменение регистрируется с помощью управляющего усилителя и через мембрану пропускается электрический ток, равный по величине, но противоположный по направлению мембранному ионному току. При этом трансмембранная разность потенциалов не изменяется. Совместное использование метода фиксации потенциала и специфических блокаторов ионных каналов привело к открытию различных типов ионных каналов в клеточной мембране. *Метод настолько чувствителен, что позволяет наблюдать поведение и химические превращения единичных молекул, взаимо-*

действующих с мембраной. Разработаны экспериментальные протоколы, позволяющие измерять характеристики ионных каналов оптимальным образом. Немецкие исследователи Эрвин Неер и Берт Сакман, разработавшие эту методику, получили Нобелевскую премию в 1991 году.

Однако, состояние электрической проводимости одного канала не дает возможность оценить, каким образом изменение состояния множества каналов (количества открытых каналов, продолжительности их открытия, чувствительности их к агонистам и т.д.) оказывает влияние на сократительную активность гладкомышечной клетки, состояние сосудистой стенки, а следовательно, диаметр кровеносного сосуда и в конечном итоге на количество крови, поступающей по данному сосуду к органу в единицу времени.

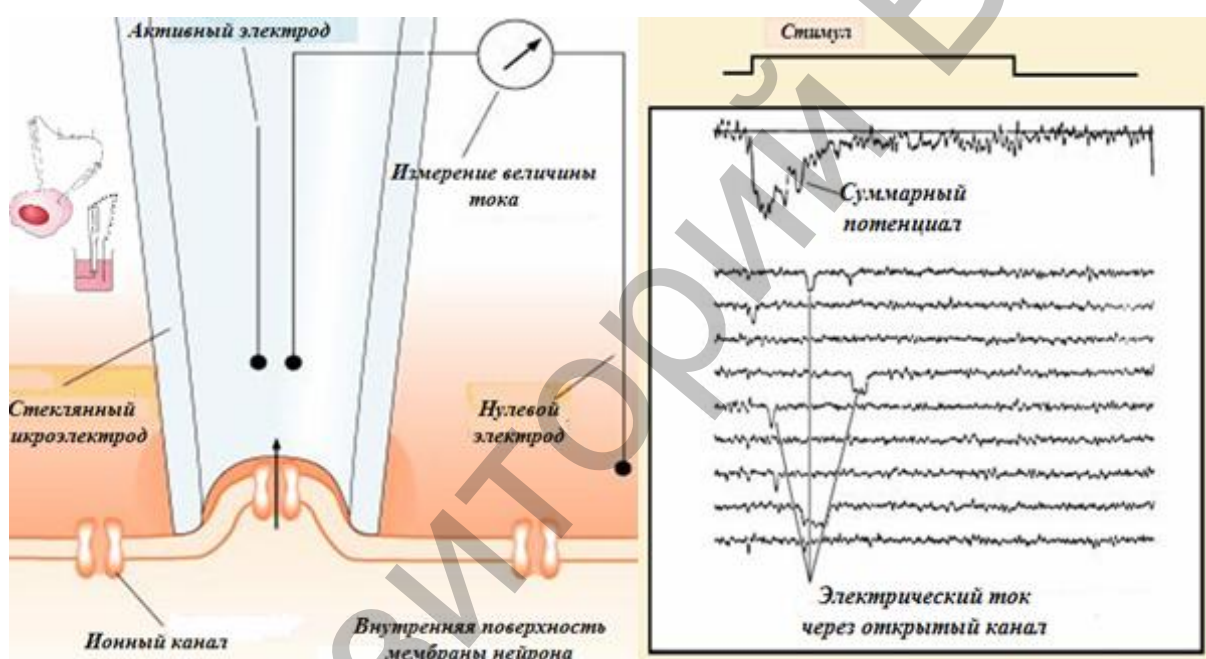


Рис. 11.14. Электрофизиологическая методика для изучения свойств ионных каналов.

Yusuke Ohya et. al. (1996) было установлено, что максимальная релаксация или гиперполяризация гладкомышечных клеток не обязательно требует максимального открытия каналов. Следовательно, изменение электрического заряда на мембране более говорит о их влиянии на величину мембранного потенциала, чем на функциональную активность целой клетки. В связи с этим представляет большой интерес изучение влияния блокаторов и активаторов калиевых каналов на интегральный ответ ткани (мышцы сердца, гладкомышечных клеток, клеток поджелудочной железы и др.), а не канала [28].



Рис. 11.15. Установка для перфузии изолированного сердца мелких лабораторных животных.



Рис. 11.16. Установка для перфузии изолированного сегмента мелких лабораторных животных.

Изучение функциональной активности ионных каналов может проводиться на изолированных органах (сердца – рис. 11.15 – или изолированном сегменте артериального сосуда – рис. 11.16). Так, например, для исследования роли каналов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда в раствор, которым перфузируют изолированное сердце или сегмент сосуда, добавляют блокатор (активатор) одного из изучаемых калиевых каналов (табл. 11.1). Вклад ионных каналов в регуляцию тонуса сосудов определяют по величине вазоконстрикторного (вазодилаторного) эффекта блокатора (активатора), выраженного в % от исходного кровотока изолированного сердца или напряжения изолированного сегмента артериального сосуда.

5.4. Структура и функции K_{IR} -каналов

Каналы внутреннего выпрямления (K_{IR}) впервые были идентифицированы в мозговых кровеносных сосудах (рис. 11.17). В отличие от кальцийзависимых и потенциалзависимых калиевых каналов K_{IR} -каналы открываются в результате гиперполяризации мембраны и, вероятно, играют важную роль в поддержании мембранного потенциала. Каналы внутреннего выпрямления очень чувствительны к незначительным внеклеточным концентрациям ионов бария. Ионы бария оказывают ингибиторный эффект и на другие калиевые каналы, однако его эффект достигается значительными концентрациями.

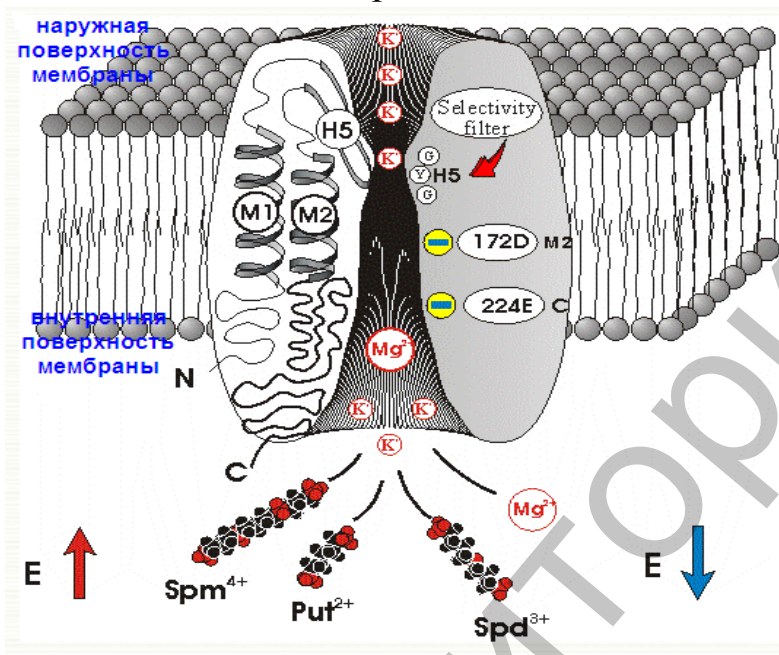


Рис. 11.17. Общая структура K_{IR} -каналов.

Недостаточно изучен вопрос относительно функционального значения калиевых каналов внутреннего выпрямления в регуляции тонуса сосудов. Предлагают, что K_{IR} -каналы могут играть важную роль в вазодилаторном ответе на внеклеточный калий. Незначительные повышения концентрации внеклеточных ионов калия производят к гиперполяризации и расслаблению мозговых артерий. Оба эф-

фекта легко ингибируются относительно низкими концентрациями ионов бария, но не комбинацией тетраэтиламмония (блокатор кальцием активируемых калиевых каналов – BK_{Ca}), глибенкламида (блокатор АТФ-чувствительных калиевых каналов) и 4-аминопиридина (блокатор потенциалзависимых калиевых каналов K_V). Это дает основание полагать, что ответ осуществляется калиевым каналом внутреннего выпрямления. Этот механизм потенциально важен, потому что малейшие увеличения концентрации внеклеточного калия, такие, как те, которые могли бы произойти во время нейронной активации, приводят к расширению мозговых кровеносных сосудов в естественных условиях.

Таблица 11.1 – Блокаторы калиевых каналов, действующие на внешнюю поверхность гладкомышечных клеток

Тип калиевых каналов	Ba^{2+}	Глибенкламид	4-аминопиридин	Харибдотоксин, ибериотоксин	Тетраэтиламмоний (ТЭА)
K_v	Полумаксимальная блокирующая концентрация $>1 \text{ mM}$	Нет эффекта при 10 mM	Полумаксимальная блокирующая концентрация $0,2-1,1 \text{ mM}$	Нет эффекта	Полумаксимальная блокирующая концентрация 10 mM
K_{Ca}	Минимальный эффект при 10 mM	Нет эффекта при 10 mM	Полумаксимальная блокирующая концентрация $>5 \text{ mM}$	Полумаксимальная блокирующая концентрация $>1 \text{ mM}$	Полумаксимальная блокирующая концентрация $0,2 \text{ mM}$
K_{IR}	Полумаксимальная блокирующая концентрация 2 mM при -60 mV	Нет эффекта при 10 mM	10% блокады при 1 mM	Нет эффекта	Нет эффекта при 1 mM
K_{ATP}	Полумаксимальная блокирующая концентрация 100 mM при -80 mV	Полумаксимальная блокирующая концентрация $20-100 \text{ nM}$	Полумаксимальная блокирующая концентрация $0,2 \text{ mM}$	Нет эффекта	Полумаксимальная блокирующая концентрация 7 mM

Примечание: ионы Ba^{2+} блокируют калиевые каналы в зависимости от величины мембранного потенциала с очевидной аффинностью увеличивающейся на каждые 24 mV гиперполяризации. Харибдотоксин и ибериотоксин также действуют в потенциалзависимой манере и их эффект возрастает по мере увеличения гиперполяризации. Ионы ТЭА блокирует калиевые каналы при увеличении гиперполяризации мембраны.

5.5. Структура и функции АТФ-чувствительных калиевых каналов

АТФ-чувствительные каналы ингибирует внутриклеточный АТФ, а низкое соотношение концентраций АТФ/АДФ открывает каналы. Активность их зависит также от градиента рН снаружи и внутри клетки, очень слабо – от мембранного потенциала.

АТФ-чувствительный калиевый канал представляет собой гетерооктамерный комплекс, включающий две субъединицы: $K_{IR}6.X$ ($K_{IR}6.1$ или $K_{IR}6.2$), субъединицу, формирующую пору, и сульфонилмочевинный рецептор (SUR) – регуляторную субъединицу, которая является рецептором для сульфонилмочевины [29] (рис. 11.18). $K_{IR}6.X$ субъединица [30] относится к семейству каналов внутреннего выпрямления (K_{IR} -калиевым каналам), в состав которых входят два трансмембранных домена. Также различают три изоформы рецептора сульфонилмочевины: SUR 1 – высокоаффинный рецептор, SUR 2 и SUR 3 – низкоаффинные рецепторы.

Структурно калиевые каналы в различных тканях неодинаковы по составляющим субъединицам. Так, в бета-клетках островков поджелудочной железы и глюкозочувствительных нейронах гипоталамуса они имеют состав SUR 1/ $K_{IR}6.2$; в мышце сердца – SUR 2A/ $K_{IR}6.2$ и в гладкомышечных клетках сосудов – SUR 2B/ $K_{IR}6.1$ (или $K_{IR}6.2$).

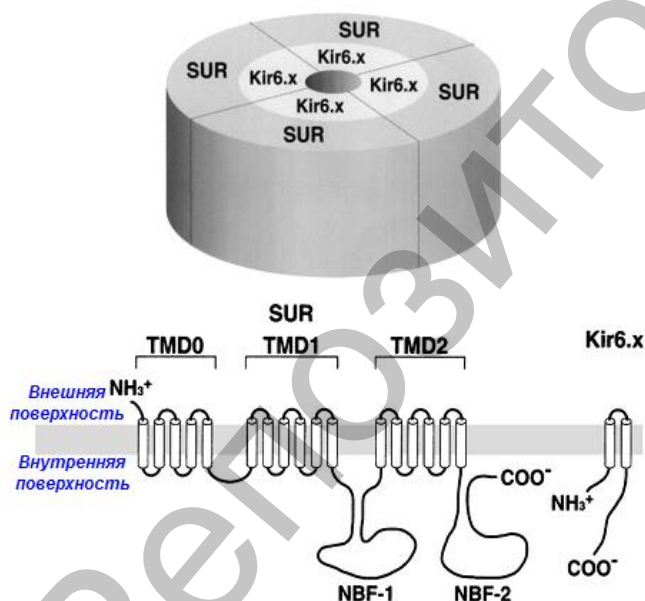


Рис. 11.18. Структура K_{ATP} -канала.

Сульфонилмочевинный рецептор имеет три трансмембранных домена TMD0, TMD1 и TMD2. На цитоплазматической стороне сульфонилмочевинного рецептора имеются два региона, с которыми связываются динуклеотиды NBF-1 и NBF-2. NBF-1 и NBF-2 локализованы в виде петель между TMD1 и TMD2 соответственно. SUR 1 белок проявляет высокое сродство к производным сульфонилмочевины, таким, как глибенкламид. Показано, что электрофизиологические свойства димера SUR 1 и $K_{IR}6.2$ сходны с таковыми из K_{ATP} -канала бета-клетки поджелудочной железы. Стехиометрия 1:1 достаточна, чтобы сформировать функциональные каналы. Биохимические исследования определили молекулярную массу $K_{IR}6.2$ /SUR 1 комплекса, которая соответствовала приблизительно 950 kDa [31].

электрофизиологические свойства димера SUR 1 и $K_{IR}6.2$ сходны с таковыми из K_{ATP} -канала бета-клетки поджелудочной железы. Стехиометрия 1:1 достаточна, чтобы сформировать функциональные каналы. Биохимические исследования определили молекулярную массу $K_{IR}6.2$ /SUR 1 комплекса, которая соответствовала приблизительно 950 kDa [31].

В работе Russell (2002) было показано, что креатинкиназа является интегративной частью белкового комплекса K_{ATP} -каналов сердечной мышцы. Креатинкиназа тесно связана с проксимальной частью SUR 2A субъединицей. А также в этой работе продемонстрирована модель регуляции ATP -чувствительного калиевого канала, включающая аденилатциклазу и креатинкиназу [32].

5.6. Структура и функция BK_{Ca} -каналов

Ca -активируемые K -каналы имеют проводимость от 10 pS (каналы низкой проводимости) до 250 pS (каналы высокой проводимости). Вероятность их открывания возрастает как при увеличении Ca^{2+} от 10^{-7} до 10^{-5} М, так и при деполяризации мембраны при постоянной концентрации Ca^{2+} . Эти каналы обычно блокируются ионами бария и хинином, иногда также антагонистами кальмодулина: кальмидазолиумом, трифторперазином, галоперидолом.

BK_{Ca} -каналы обнаружены в различных клетках: в лимфоцитах, эритроцитах, нейронах центральной нервной системы, гладкомышечных клетках мочевого пузыря, трахеи, миоцитах сосудистой стенки.

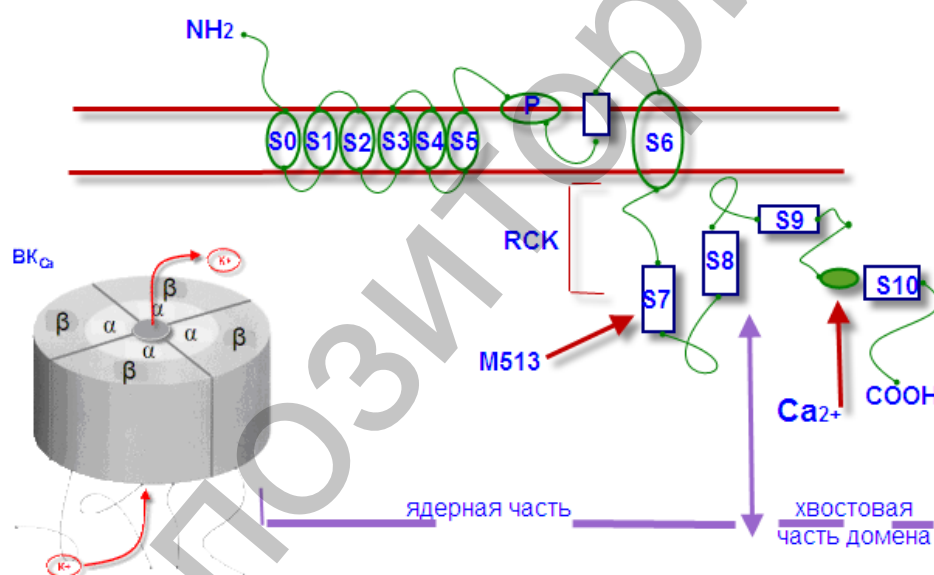


Рис. 11.19. Структура BK_{Ca} -калиевого канала.

BK_{Ca} -каналы включают четыре α - и четыре β -субъединицы (рис. 11.19).

Основной субъединицей, определяющей функциональную активность BK_{Ca} -канала, является β -субъединица, которая расположена с внешней стороны поры канала и состоит из 11 гидрофобных областей (S0–S10), основные из них – трансмембранные домены (S0–S6). С наружной стороны мем-

браны трансмембранные домены заканчиваются NH_2 -группой. Остальные четыре домена (S7–S10) расположены в цитоплазме и имеют на конце COOH -группу [33]. Домен S4 содержит несколько положительно заряженных аминокислот и, вероятно, представляет собой рецептор канала. Четыре α -субъединицы формируют внутреннюю стенку поры канала. Недавние исследования показали, что α -субъединица чувствительна к изменениям концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Это свойство может быть связано с так называемым участком « Ca^{2+} Bowl», расположенным в области хвоста белка. Функциональная активность BK_{Ca} -каналов находится в прямой зависимости от концентрации ионов кальция внутри гладкомышечной клетки [34].

BK_{Ca} -каналы играют важную роль в расслаблении гладкомышечных клеток сосудов. Открытие BK_{Ca} -каналов связано с увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция, что сопровождается выходом ионов калия из клетки и развитием гиперполяризации мембраны (рис. 11.20).

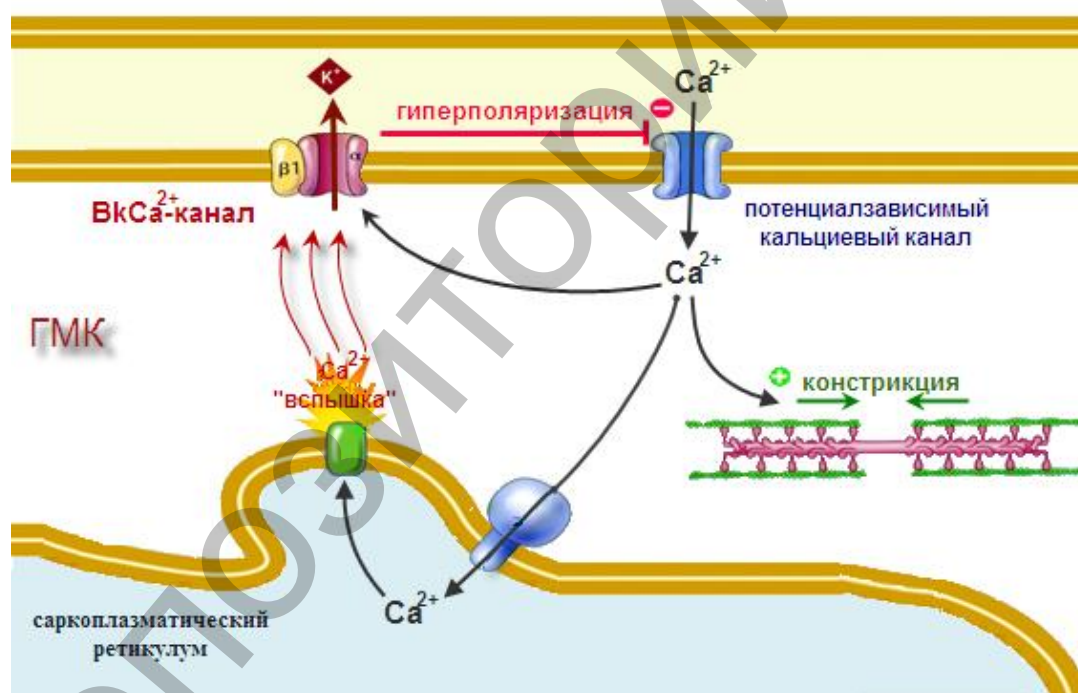


Рис. 11.20. Механизм расслабления гладкомышечных клеток.

Это приводит к закрытию потенциалзависимых кальциевых каналов и расслаблению гладкомышечных клеток. Таким образом BK_{Ca} -каналы оказывают демпфирующий эффект на зависимую от деполяризации активацию кальциевых каналов, ограничивают количество входящих в клетку ионов кальция, что способствует ослаблению сократительной активности гладкомышечных клеток и следовательно снижению тонуса

сосудов. Итак, ионы кальция играют важную роль не только в сокращении, но и расслаблении сосудистой стенки.

В нейронах центральной нервной системы $ВК_{Ca}$ -каналы принимают участие в высвобождении нейромедиаторов и регуляции возбудимости нейрональных клеток. Доказано, что в нейронах одиночного ядра кальций-зависимый компонент калиевых токов определяет структуру паттерна генерируемых потенциалов действия нейрона и их формы (облегчение реполяризации и усиление реполяризационной гиперполяризации). Кроме того, активатор $ВК_{Ca}$ -каналов BMS-204352, введенный в дозах 0,1–0,03 мг/кг в течение 10 минут после экспериментального сотрясения головного мозга, уменьшал размеры отека головного мозга, улучшал метаболические процессы в поврежденных тканях и проявлял некоторую нейропротекторную активность [35].

5.7. Структура и функция потенциалзависимых (K_v) калиевых каналов

Потенциалзависимые K-каналы представлены по крайней мере 5 разными структурами с проводимостью от 1 до 150 pS, расположенными как в плазматической мембране, так и в саркоплазматическом ретикулуме. Общим свойством этих каналов является чувствительность к ингибирующему действию тетраэтиламмония, 4-аминопиридина и Cs, хотя эффективность действия этих ингибиторов на разные подтипы каналов существенно различна. Эти каналы активируются при деполяризации и осуществляют реполяризацию мембраны во время потенциала действия. Скорость их инактивации низка – от 100 мс до нескольких секунд.

Типичный потенциалзависимый канал представляет собой 4 идентичные трансмембранные субъединицы, окружающие центральный канал. Каждая субъединица имеет 6 трансмембранных пересечений (S1–S6), как с N, так С-окончаниями, расположенными на внутренней поверхности мембраны. Узкая часть поры представляет собой селективный фильтр, образуемый петлей между S5 и S6. Потенциал-чувствительный сенсор включает в себя S4 регион с имеющимися на нем положительными зарядами (рис. 11.21).

Вероятность открытия потенциалзависимого калиевого канала, подобно кальцийактивируемым калиевым каналам, увеличивается при развитии деполяризации. Когда клетка деполяризована, K_v -каналы активируются и появляется выходной ток, который возвращает мембранный потенциал к уровню потенциала покоя.

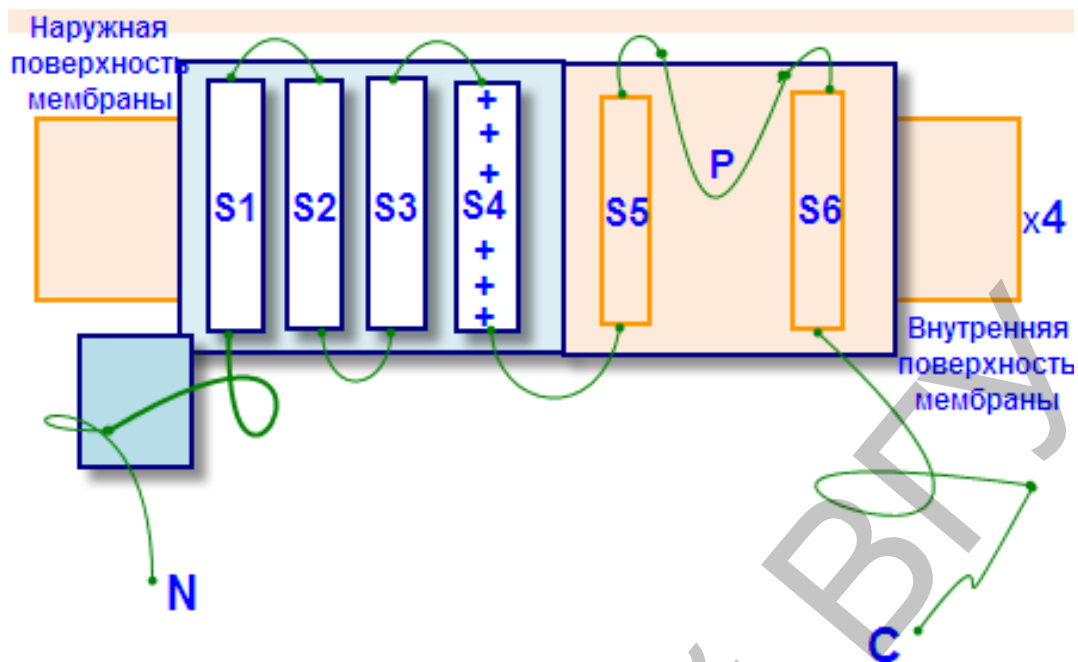


Рис. 11.21. Структура потенциалзависимого калиевого канала.

Таким образом, K_V -каналы, очевидно, представляют собой систему отрицательной обратной связи, также, как и K_{Ca} -каналы, которые модулируют сосудистый тонус. В настоящее время потенциалзависимые калиевые каналы, экспрессирующиеся в гладкомышечных клетках, клонированы. Селективным блокатором K_V -каналов является 4-аминопиридин. 4-аминопиридин очень часто используется для того, чтобы разграничить эффекты K_V -каналов и K_{Ca} -каналов, так как оба типа каналов активируются при деполяризации мембраны. Активность потенциалзависимых калиевых каналов может подавляться ионами цезия и высокими концентрациями тетраэтиламмония и глибенкламида [36].

Относительно мало известно о физиологическом значении этих каналов в гладкомышечных клетках артериальных сосудов. Подобно K_{Ca} -каналам, активация потенциалзависимых калиевых каналов может вносить свой вклад в регуляцию мембранного потенциала и ответ артерий на изменение артериального давления. Можно предположить, что K_V -каналы могут ограничивать вазоконстрикторный ответ, возникающий при действии стимулов, деполяризующих мембрану гладкомышечных клеток. Поскольку уменьшение внутриклеточного pH увеличивает ток через потенциалзависимые калиевые каналы, предположили, что эти каналы имеют значение при возникновении вазодилатации, возникающей во время ацидоза или гиперкапнии. В сосудах легких, как уже сообщалось, NO активирует потенциалзависимые калиевые каналы. 4-аминопиридин частично ингибирует гиперполяризацию и расслабление этих артерий в ответ на NO, кото-

рый в этих артериях активирует K_v -каналы. Пока неизвестно, вносит ли вклад подобный механизм в опосредуемую NO релаксацию гладкомышечных клеток мозговых артерий.

6. Свободные радикалы кислорода и азота в физиологии клетки

Хорошо известно, что свободные радикалы (главным образом, активные формы кислорода (АФК) и азота АФN) – являются токсичным побочным продуктом метаболизма и могут повреждать белки, липиды мембран и нуклеиновые кислоты. Например, динамическое равновесие между образованием АФК и их ликвидацией в клетке поддерживается благодаря антиоксидантным системам, в числе которых белки и низкомолекулярные вещества. Исследования последних лет показали, что *АФК, образующиеся в клетках в незначительных количествах, участвуют в регуляции важнейших физиологических процессов, включая рост и развитие, ответ на биотические и абиотические стрессы, программируемую клеточную смерть.* Главным источником АФК в клетках являются митохондрии. Обычно примерно 98% всего кислорода, поступающего в клетки, используется для окисления субстратов с образованием АТФ и выделением тепла, и лишь 2% используется в реакциях образования АФК, которое может значительно возрастать при усиленном поступлении кислорода в клетки или нарушении работы электронно-транспортной цепи митохондрий.

6.1. От окислительного стресса к редокс-регуляции: историческая справка

Свободные радикалы в биологическом материале были обнаружены менее 50 лет назад [37]. Вскоре после этого Denham Harman предположил, что радикалы кислорода являются продуктами побочных реакций. В 1956 году он описал свободные радикалы (СР) как зло ящика Пандоры, которое необходимо учитывать в развитии процесса повреждения клеток, мутагенеза, канцерогенеза и старения [38]. Генерация большого количества свободных радикалов в клетке, в частности активных форм кислорода сопровождается окислением нуклеотидов нуклеиновых кислот, липидов мембран и белков (рис. 11.22).

Учение о свободных радикалах в живых организмах вступило во второй этап своего развития после того, как McCord и Fridovich [39] открыли фермент супероксиддисмутазу (СОД) и убедили большинство своих коллег, что свободные радикалы имеют важное значение в биологии. Воодушевленные этим, многочисленные исследователи стали изучать различные повреждения ДНК, белков и липидов, а также других компонентов клетки

АФК. Третий этап начался с того, что было сообщено о благоприятных биологических эффектах свободных радикалов.

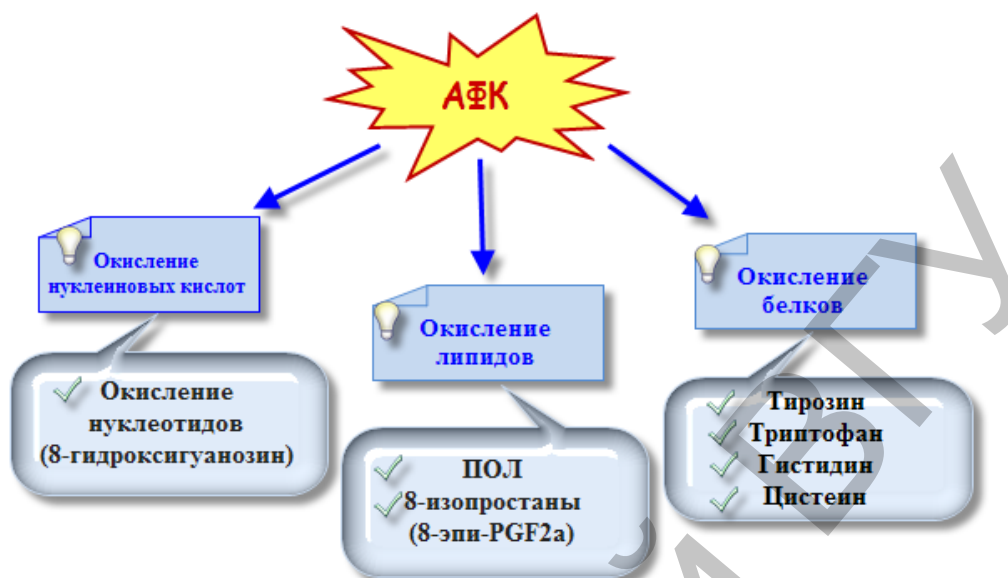


Рис. 11.22. Продукты свободнорадикального повреждения.

Mittal и Murard [40] доказали, что супероксиданион через его производное гидроксил-радикал стимулирует активацию гуанилатциклазы и образование «вторичного посредника» ц-ГМФ. Ignarro, Kadowich [41] и Moncada с соавт. независимо друг от друга открыли роль монооксида азота как молекулы, регулирующей расслабление гладких мышц и ингибирующей адгезию тромбоцитов. Roth и Droge обнаружили, что в активированных Т-клетках супероксид-анион или низкомолярные концентрации пероксида водорода увеличивают продукцию факторов роста Т-клеток – интерлейкина 2; Keyse и Tytgel показали, что пероксид водорода индуцирует экспрессию гена гемоксидазы (HO-1). Storz с соавт. [42] сообщили об активации фактора транскрипции NF-kB в клетках млекопитающих посредством пероксида водорода. К началу XXI столетия накопилось большое количество фактов, указывающих на то, что живые организмы не только приспособились к враждебному сосуществованию со свободными радикалами, но также фактически приобрели механизмы, позволяющие им использовать свободные радикалы в механизмах физиологической регуляции функции клеток. Важными физиологическими функциями, в регуляции которых принимают участие свободные радикалы или их производные, являются: регуляция тонуса сосудов, восприятие напряжения кислорода и регуляция функций, контролируемых концентрацией кислорода, усиление передачи сигнала от рецепторов, расположенных на мембранах, включая рецепторы

к антигену на лимфоцитах и ответы на окислительный стресс, которые обеспечивают поддержание редокс-гомеостаза (табл. 11.2).

Область изучения редокс-регуляции привлекла внимание клиницистов с точки зрения выяснения роли окислительного стресса в развитии многочисленных патологических процессов. Было показано, что редокс-регуляция имеет важное значение в развитии многочисленных патологических процессов и состояний. Хрупкий баланс между благоприятными и неблагоприятными эффектами свободных радикалов является, несомненно, важным аспектом жизни.

Таблица 11.2 – Важные физиологические функции, в регуляции которых вовлечены свободные радикалы или их производные

Тип радикала	Источник радикала	Физиологический процесс
Монооксид азота ($\text{NO}^\bullet$)	NO-синтаза	Расслабление гладких мышц (регуляция тонуса сосудов) и др. ц-ГМФ зависимые функции
Супероксиданион ($\text{O}_2^{\bullet-}$) и связанный с ним АФК	НАДФН-оксидаза	Регуляция вентиляции легких, продукция эритропоэтина и др., гипоксия индуцированных функций. Расслабление гладких мышц. Передача сигнала от различных мембранных рецепторов, усиление иммунологических функций
Супероксиданион ($\text{O}_2^{\bullet-}$) и связанный с ним АФК	Разные источники	Ответы на окислительный стресс и поддержание редокс-гомеостаза

Научные исследования о биологической роли редокс-регуляции являются быстрорастущей областью науки, оказывая влияние на многочисленные дисциплины, такие, как физиология, клеточная биология и клиническая медицина.

6.2. Основные типы свободных радикалов и их производные

Активные формы кислорода. Супероксид-анион ($\text{O}_2^{\bullet-}$) образуется при одновалентном восстановлении молекулы кислорода в триплетном состоянии ($^3\text{O}_2$). Этот процесс идет при участии ферментов таких, как НАДФН-оксидаза и ксантиноксидаза, или неферментативно при участии редокс-активных соединений, таких, как семиубихинон электронно-транспортной цепи митохондрий. Супероксиддисмутазы превращают супероксид-анион в пероксид водорода. В тканях супероксид-анион может неферментативно превращаться в пероксид водорода и синглетный кислород. В присутствии металлов, таких, как ионы железа или меди, пероксид

водорода может превращаться в высокоактивный гидроксил радикал ($\cdot\text{OH}$). Напротив, пероксид водорода может быть превращен в воду ферментом каталазой или глутатион-пероксидазой. При действии глутатион-пероксидазы восстановленный глутатион превращается в окисленный глутатион дисульфид, который затем превращается в восстановленный глутатион в присутствии НАДФН (рис. 11.23).

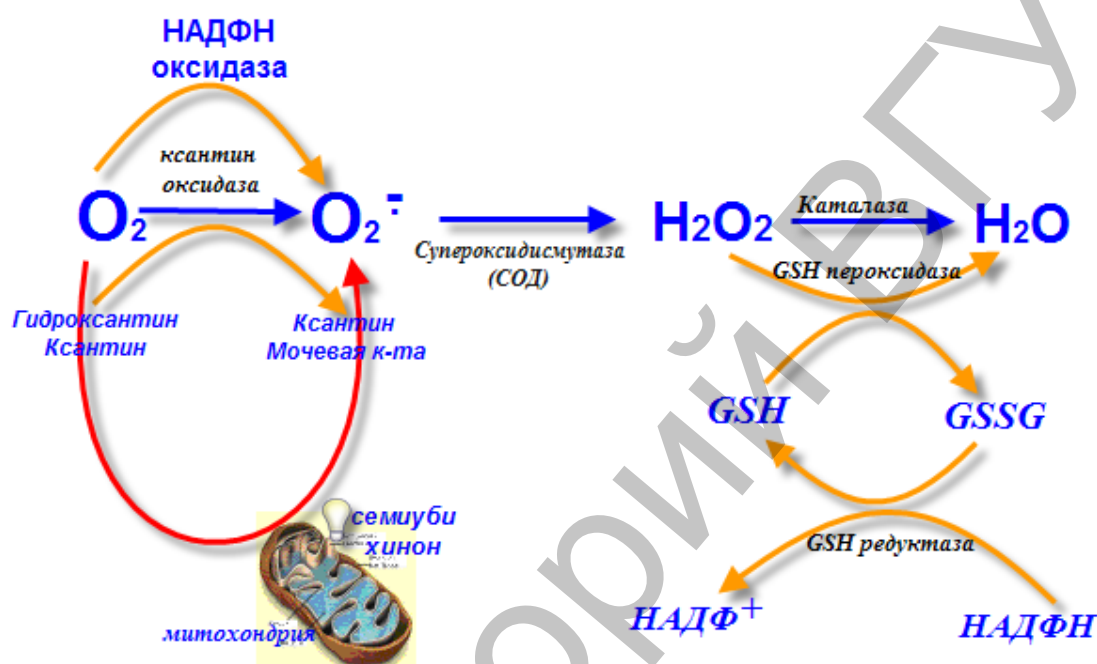


Рис. 11.23. Образование и удаление АФК.

Поскольку супероксид-анион и монооксид азота способны превращаться при помощи ферментативных и неферментативных химических реакций в активные нерадикальные формы, такие, как синглетный кислород, пероксид водорода или пероксинитрит, то есть в формы, которые могут, в свою очередь, создавать новые радикалы и влиять на различные функции клетки. Большинство из регуляторных эффектов вызывается не прямым действием супероксид-аниона, а скорее действием его производных. Очень часто различные активные формы сосуществуют вместе с протекающей реакцией и затрудняют идентификацию агента, который отвечает за биологический эффект.

Активные формы азота. Радикал монооксида азота у высших организмов образуется при окислении одного из конечных гуанидиновых атомов азота L-аргинина. Этот процесс катализируется ферментом NO-синтазой. В зависимости от микроокружения монооксид азота может превращаться в активные формы азота, такие, как катион нитрозониума (NO^+),

нитроксил-анион (NO^-) и/или пероксинитрит (ONOO^-). Некоторые физиологические эффекты могут быть вызваны S-нитрозо-цистеином или S-нитрозо-глутатионом.

6.3. Окислительный стресс как модель редокс сигнального пути

Редокс-гомеостаз. Термин редокс-сигнальный путь, или редокс-регуляция, широко используется для описания процессов, которые берут свое начало в окислительно-восстановительных реакциях (redox chemistry). Редокс-регуляция обнаружена у различных организмов, включая бактерии. Значение его заключается в защитном эффекте от окислительного повреждения и восстановления первоначального состояния редокс-гомеостаза после кратковременного воздействия свободных радикалов.

Окислительно-антиокислительное равновесие. Свободные радикалы и их производные существуют в клетках в низких, но измеряемых концентрациях. Их концентрация определена балансом между скоростью их образования и скоростью их элиминации при помощи различных антиоксидантных соединений и ферментов (рис. 11.24).

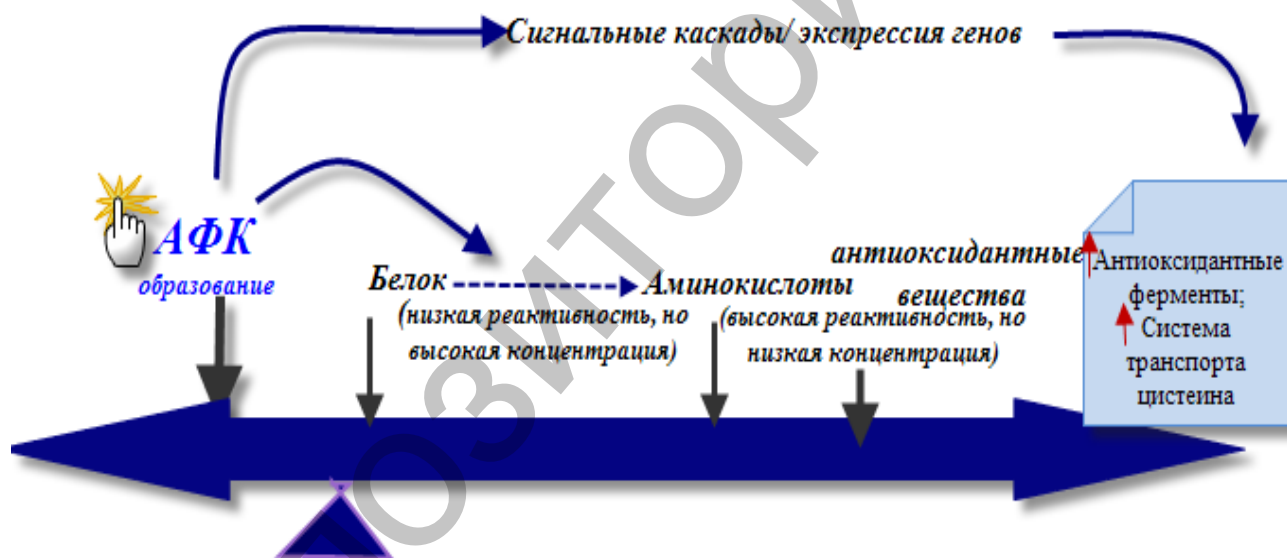


Рис. 11.24. Механизмы редокс-гомеостаза.

Halliwell и Gutteridge [38] определили антиоксиданты как вещества, которые способны в относительно низких концентрациях конкурировать с другими окислительными субстратами, существенно замедляя или ингибируя окисление этих субстратов. Это определение включает ферменты: СОД, глутатионпероксидазу, каталазу, так же, как и неферментативные вещества, такие, как α -токоферол (витамин Е), β -каротин, аскорбиновая кислота (витамин С) и глутатион.

Кроме того, есть вещества, которые обладают относительно низкой специфичной антиоксидантной активностью, но при повышении их концентрации могут вносить существенный вклад в антиоксидантную активность клетки. Такими антиоксидантами являются: свободные аминокислоты, пептиды и белки. Практически все аминокислоты могут служить мишенью для окислительной атаки АФК, однако, некоторые аминокислоты, такие, как триптофан, тирозин, гистидин и цистеин, особенно чувствительны к АФК. В связи со значительным накоплением в клетке свободных аминокислот (вплоть до 10^{-1}M) свободные аминокислоты представляют собой важную ловушку активных форм кислорода.

Окисленные белки как субстрат протеолиза и их вклад в гомеостаз.

Активные формы кислорода вызывают модификацию белков. Эти окисленные модификации белков могут приводить к изменению их функции, химической фрагментации или увеличению чувствительности к протеолитическому воздействию. Протеолитическое разрушение белков осуществляется главным образом протеасомами. В одной из первых работ было установлено, что протеолиз возрастает более чем в 11 раз после экспозиции с супероксид-анионом или пероксидом водорода [43]. Пероксид водорода в концентрации 20–400 мкМ усиливает протеолиз, но в mM концентрациях блокирует его и может приводить к внутриклеточному накоплению окисленных белков.

Белки существенно отличаются по их чувствительности к окислительному стрессу. Редокс-чувствительные аминокислоты альбумина в сыворотке быка, как было показано, способны окисляться в два раза быстрее, чем глутатионсинтетаза, а интактные белки менее чувствительны к окислению, чем свернувшиеся белки. Эти факты указывают на: (1) в процессе филогенетической эволюции произошел отбор белков, которые были относительно хорошо устойчивы к окислению; (2) антиоксидантная активность интактных белков значительно слабее свернувшихся белков или аминокислот. Окисление белков и усиление их протеолиза представляют собой процесс химического улавливания АФК (рис. 11.24). Эксперименты показали, что предварительная обработка клеток скелетной мышцы человека ингибиторами протеасом вызывало существенное увеличение внутриклеточного уровня АФК, который уменьшался при добавлении аминокислот. В настоящее время необходимо системное исследование, посвященное выяснению вклада аминокислот, белков и классических антиоксидантов и ферментов в общий антиоксидантный потенциал клеток и тканей.

Изменение прооксидантно-антиоксидантного баланса как триггер редокс-регуляции: теория редокс-гомеостаза. Живые клетки и ткани имеют несколько механизмов восстановления первоначального редокс-состояния после кратковременного влияния высоких концентраций АФК и АФА. Например, образование монооксида азота ($\text{NO}\cdot$) по принципу отрицательной обратной связи ингибирует активность NO-синтазы. Увеличение концентрации АФК в многочисленных клетках вызывает экспрессию генов, ответственных за образование веществ, увеличивающих антиоксидантную активность клетки (рис. 11.24).

Главный механизм редокс-гомеостаза основывается на АФК-опосредованной индукции редокс-чувствительных сигнальных каскадов, которые приводят к экспрессии антиоксидантных ферментов или сопровождаются усилением активности систем транспорта цистеина, который, в свою очередь, увеличивает в некоторых клетках внутриклеточную концентрацию глутатиона. Более того, в связи с тем, что белки в значительно меньшей степени улавливают АФК, чем эквивалентное содержащееся в них количество аминокислот, возможно предположить, что усиление протеолиза при окислительном стрессе также вносит существенный вклад в поддержание гомеостаза.

Клетки или ткани находятся в стабильном состоянии, если скорость образования АФК и емкость их ловушек постоянны и находятся в состоянии баланса. Включение редокс-сигнального пути происходит в том случае, если нарушается данный баланс, либо за счет увеличения концентрации АФК, либо благодаря уменьшению активности одной или более антиоксидантных систем. У высших организмов активация окисления может представлять собой один из регуляторных механизмов, в основе которого лежит активация эндогенных систем генерации АФК и АФА. Однако подобные ответы могут быть вызваны состояниями, сопровождающимися окислительным стрессом, развивающимся в ответ на факторы окружающей среды. Если изначально концентрация АФК увеличивается незначительно, то ответ антиоксидантной системы может быть достаточным, чтобы компенсировать это увеличение, восстановив баланс АФК благодаря их элиминации. Таким образом, физиологическое проявление типичного включения редокс-регуляторного механизма является кратковременным увеличением и/или кратковременным сдвигом тиолдисульфидного редокс-состояния в сторону окисленного глутатиона. При дальнейшем развитии событий эти механизмы направлены на поддержание стабильного состояния, называемого редокс-гомеостазом.

Однако, при определенных условиях образования АФК может увеличиваться в значительно большей степени и на более продолжительное время. При этом антиоксидантный ответ не обладает достаточной силой, чтобы вернуть систему к первоначальному редокс-гомеостазу. В таком случае система все же может достигнуть равновесия (рис. 11.24), но возникающее при этом стабильное состояние достигается при более высокой концентрации АФК и различных уровнях свободных аминокислот и/или экспрессии различных генов (активируемой редокс-чувствительными сигнальными путями). Индикаторы подобного сдвига в сторону окисления хорошо прослеживаются при старении, а это значит, что прооксидантный сдвиг не всегда связан только с развитием патологического процесса.

Патологический процесс может развиваться при более значительном увеличении концентрации свободных радикалов. Опять же развитие этих состояний сопряжено с нарушением гомеостаза, но при этом чаще всего наблюдается постоянный сдвиг уровня гомеостаза. В связи с этим симптомы патологического процесса возникают в результате как прямого повреждающего эффекта АФК, так и АФК-индуцируемой экспрессии генов.

Редокс-регуляция посредством изменения тиолдисульфидного состояния. Сравнительно недавно появилась концепция об участии АФК в процессах *редокс-регуляции* клеточных функций, то есть регуляции посредством окисления/восстановления некоторых специфических сульфгидрильных групп протеинов, или «редокс-сенсоров» [44]. «Редокс-сенсоры» протеинов могут быть также мишенями и для активных форм азота, которые нитрозилируют цистеиновые остатки протеинов и изменяют их функции. Редокс-чувствительными соединениями, т.е. соединениями, изменяющими свои функциональные свойства после окисления/восстановления или нитрозилирования «редокс-сенсоров», являются многие ферменты, внутриклеточные факторы транскрипции, клеточные протоонкогены, белки теплового шока, молекулы адгезии, цитокины, факторы роста и рецепторы к ним, структурные белки, белки ионных каналов и др. Действие активных форм кислорода и азота на клетку может приводить к изменению редокс-состояния клетки или ее компартментов. Редокс-состояние клетки (компартамента) определяется соотношением восстановленных (*reduced*) и окисленных (*oxidized*) форм соединений (например, восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона, НАДН и НАД⁺; НАДФН и НАДФ⁺) [44]. F. Scafer и G. Buettner полагают, что редокс-потенциал сопряженных окислительно-восстановительных реакций, протекающих в клетке, в соответствии с уравнением Нернста определяется восстанавливающей способностью

субстратов этих редокс-пар и величиной половинного восстановительного потенциала клетки. Соотношение между окисленным и восстановленным глутатионом (GSSG/GSH) не только определяет редокс-состояние клеток, но и является своеобразным «молекулярным переключателем» их фенотипических свойств. Это связано с тем, что при изменении соотношения GSSG/GSH изменяется характер активности целого ряда клеточных ферментов факторов транскрипции, молекулярных шаперонов, рецепторов, ионных каналов и др. Было установлено, что при ступенчатом изменении «половинного восстановительного потенциала клеток» (определяемого преимущественно концентрацией GSH) от отрицательной до положительной величины происходит кардинальное изменение «поведения» клеток: пролиферация→дифференцировка→апоптоз→некроз [45].

В некоторых случаях изменения внутриклеточного тиолдисульфидного редокс-состояния включает такие же, как и при действии пероксида водорода, редокс-чувствительные сигнальные белки и пути. Бактериальный OxyR является моделью редокс-чувствительного сигнального белка, который может активироваться как при прямом воздействии пероксида водорода, так и при изменении внутриклеточного изменения редокс-состояния глутатиона. Напротив, белок тирозинфосфатаза инактивируется АФК или прооксидантными изменениями внутриклеточного тиолдисульфидного редокс-состояния.

Соотношение между окисленным и восстановленным глутатионом в клетках может изменяться в условиях «окислительного» и «нитрозилирующего» стресса за счет превращения восстановленного глутатиона в окисленный глутатион или нитрозоглутатион соответственно. Чаще всего изменения соотношения GSSG/GSH в клетках при различных формах патологии (артериальной гипертензии, атеросклерозе, заболеваниях воспалительной природы, опухолях различной локализации, нейродегенеративных заболеваниях и др.) обусловлено увеличением содержания в них окисленного глутатиона [45].

Влияние карциногенеза и аллергенов на редокс-чувствительные сигнальные пути. Некоторые алкилирующие агенты представляют собой канцерогены, оказывающие влияние на редокс-чувствительные пути подобно тому, как это делают АФК. Существует высокая вероятность того, что возникающая при этом дисрегуляция сигнальных каскадов может вносить существенный вклад в процесс канцерогенеза.

Некоторые тяжелые металлы являются аллергенами. В этом отношении представляет интерес хлорид ртути. Обработка лимфоцитов мыши

хлоридом ртути вызывает появление их агрегации и активирует белок протеинкиназу p56^{lck}. Эти факты позволяют полагать, что окисление редокс-чувствительных сульфгидрильных групп некоторых сигнальных белков приводит к дисрегуляции лимфоцитов и может вносить вклад в развитие аллергии [46].

Эти примеры показывают, что механизмы редокс-регуляции могут быть мишенью воздействия различных агентов окружающей среды.

Контрольные вопросы

1. Опишите синтез NO из L-аргинина.
2. Какова структура NO-синтазы и ее изоферментов?
3. Как регулируется NO-синтаза?
4. Дайте характеристику методам изучения метаболизма оксида азота.
5. Опишите образование оксида азота в клетке и его физиологическое действие.
6. Каковы роль пероксинитрита и его биологическое значение?
7. Расскажите о возможности цитотоксического действия NO.
8. Каковы биохимическая природа и физиологическое значение эндотелинов?
9. Каковы строение и физиологическая роль простаглицлинов?
10. Каковы природа и функции эндотелиального гиперполяризирующего фактора?
11. Дайте классификацию и опишите строение калиевых каналов.
12. Каковы функции калиевых каналов?
13. Опишите основные методы исследования калиевых каналов.
14. Какова регуляторная роль свободных радикалов кислорода и азота в физиологии клетки?

Литература

1. Скулачев, В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло / В.П. Скулачев // Соросовский Образовательный Журнал. – 1996. – № 3. – С. 4–10.
2. Pryor, W.A. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide / W.A. Pryor, G.L. Squadrito // Am. J. Physiol. – 1995. – Vol. 268. – P. L699–L722.
3. Shan, K.A. Effects of peroxide on endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries / K.A. Shan, S.E. Samson, A.K. Grover // Moll. Cell. Biochem. – 1998. – Vol. 83, № 1–2. – P. 147–152.

4. Dinerman, J.L. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease / J.L. Dinerman, C.J. Lowenstein, S.H. Snyder // *Circul. Res.* – 1993. – Vol. 73, № 2. – P. 217–222.
5. Gaston, B.M. S-Nitrosylation signaling in cell biology / B.M. Gaston [et. al.] // *Mol. Interv.* – 2003. – Vol. 3, № 5. – P. 253–263.
6. Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А.Ф. Ванин // *Биохимия.* – 1998. – Т. 63. – С. 924–938.
7. Солодков, А.П. Восстановление NO_2/NO_3 цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди / А.П. Солодков, И.С. Веремей // *Сборник научных трудов.* – Витебск, 1999. – С. 274–277.
8. Kurioka, S. Analysis of urinary nitric oxide metabolites in healthy subjects / S. Kurioka [et. al.] // *Endocr. J.* – 1999. – Vol. 46, № 3. – P. 421–428.
9. Шимановский, Н.Л. Роль оксида азота в механизмах действия лекарственных веществ / Н.Л. Шимановский, К.С. Гуревич // *Международный мед. журн.* – 2000. – Т. 6, № 1. – С. 104–107.
10. Wanchu, A. Elevated nitric oxide production in patients with primary Sjogren's syndrome / A. Wanchu [et. al.] // *Clin. Rheumatol.* – 2000. – Vol. 19, № 5. – P. 360–364.
11. Сахарова, А.В. Ультраструктурная локализация NO-синтазной NADPH-диафоразы в периферическом нерве и ее изменение при дифтерийной полинейропатии / А.В. Сахарова, С.М. Ложникова // *Вестн. Рос. АМН.* – 2000. – № 4. – С. 44–48.
12. Манухина, Е.Б. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите / Е.Б. Манухина, Н.Ю. Малышев, Ю.В. Архипенко // *Вестн. Рос. АМН.* – 2000. – № 4. – С. 16–21.
13. Brown, G.C. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase / G.C. Brown // *FEBS Lett.* – 1995. – Vol. 369. – P. 136–139.
14. Busse, R. Nitric oxide, nitric oxide synthase, and hypertensive vascular disease / R. Busse, I. Fleming // *Curr. Hypertens. Rep.* – 1999. – Vol. 1, № 1. – P. 88–95.
15. Bolton, T.B. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery / T.B. Bolton, R.J. Lang, T. Takewaki // *J. Physiol.* – 1984. – Vol. 351. – P. 549–572.
16. Nilius, B. Ion channels in vascular endothelium / B. Nilius, F. Viana, G. Droogmans // *Annu. Rev. Physiol.* – 1997. – Vol. 59. – P. 145–170.

17. Coleman, H.A. Myoendothelial electrical coupling in arteries and arterioles and its implications for endothelium-derived hyperpolarizing factor / H.A. Coleman // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2002. – Vol. 29. – P. 630–637.
18. EDHF 2002 / ed. by P. Vanhoutte. – Taylor and Francis. – 2003. – P. 417.
19. Campbell, W.B. What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors? / W.B. Campbell, K.M. Gauthier // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. – 2002. – Vol. 11. – P. 177–183.
20. Rogers, P.A. H₂O₂-induced redox-sensitive coronary vasodilation is mediated by 4-aminopyridine-sensitive K⁺-channels / P.A. Rogers [et. al.] // Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2006. – Vol. 291. – P. H2473–H2484.
21. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant / M.D. Randall [et. al.] // Biochem. Biophys. res. commun. – 1996. – Vol. 229. – P. 114–120.
22. Tosaki, A. Comparisons of ESR and HPLC methods for the detection of hydroxyl radicals in ischemic/reperfused hearts. A relationship between the genesis of oxygen-free radicals and reperfusion-induced arrhythmias. / A. Tosaki [et. al.] // Biochem. Pharmacol. – 1993. – Vol. 45. – P. 961–969.
23. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains / L. Hayflick // Exp. Cell. Res. – 1965. – Vol. 37. – P. 614–636.
24. International Union of Pharmacology. Ion Channel Compendium: potassium channels. International Union of Pharmacology [Electronic resource]. – 2002. – Mode of access: www.iuphar.org.
25. Nilius, B. Ion channels and their functional role in vascular endothelium / B. Nilius, G. Droogmans // Physiol. Rev. – 2001. – Vol. 81. – P. 1415–1459.
26. Schnitzler, M.M. ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart / M.M. Schnitzler [et. al.] // J. Physiol. – 2000. – Vol. 525. – Pt. 2. – P. 307–317.
27. Kane, G.C. ATP-Sensitive K-Channel knockout compromises the metabolic benefit of exercise training, resulting in cardiac deficits / G.C. Kane [et. al.] // Diabetes. – 2004. – Vol. 53. – Suppl. 3. – S169–S175.
28. Yusuke, Ohya. Impaired action of levcromakalim on ATP-sensitive K⁺ channels in mesenteric artery cells from spontaneously hypertensive rats / Ohya Yusuke [et. al.] // Hypertension. – 1996. – Vol. 27. – P. 1234–1239.
29. Ashcroft, F.M. Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels / F.M. Ashcroft // Trends Neurosci. – 1998. – Vol. 21, N 7. – P. 288–294.

30. Shyng, S. Control of rectification and gating of cloned K_{ATP} channels by the Kir6.2 subunit / S. Shyng, T. Ferrigni, C.G. Nichols // *J. Gen. Physiol.* – 1997. – Vol. 110, N 2. – P. 141–153.
31. Clement, J.P. Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits / J.P. Clement [et. al.] // *Neuron.* – 1997. – Vol. 18, N 5. – P. 827–838.
32. Russell, M. Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K^+ channel in vivo / M. Russell [et. al.] // *FASEB Journal.* – 2002. – Vol. 16. – P. 102–104.
33. Ledoux, J. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone / J. Ledoux [et. al.] // *Physiology.* – 2006. – Vol. 21, № 1. – P. 69–78.
34. Cui, J. Molecular mechanism of BK channel activation / J. Cui, H. Yang, U.S. Lee // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – Vol. 66, № 5. – P. 852–875.
35. Белугин, С.Н. Кальцийзависимые калиевые токи нейронов одиночного ядра при почечной гипертензии / С.Н. Белугин // *Здравоохранение.* – 2009. – № 2. – С. 20–25.
36. Tu, P. Oxidative stress, mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease / P. Tu [et. al.] // *Lab. Invest.* – 1997. – Vol. 76. – P. 441–456.
37. Commoner, B. Free radicals in biological materials / B. Commoner, J. Townsend, G.E. Pake // *Nature.* – 1954. – Vol. 174. – P. 689–691.
38. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – 2nd ed. – Oxford, UK: Clarendon, 1989.
39. Mccord, J.M. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) / J.M. Mccord, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1969. – Vol. 244. – P. 6049–6055.
40. Mittal, C.K. Activation of guanylate cyclase by superoxidedismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation / C.K. Mittal, F. Murad // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – Vol. 74. – P. 4360–4364.
41. Ignarro, L.J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation / L.J. Ignarro, P.J. Kadowitz // *Ann. Pharmacol. Toxicol.* – 1985. – Vol. 25. – P. 171–191.
42. Storz, G. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation / G. Storz, L.A. Tartaglia, B.N. Ames // *Science.* – 1990. – Vol. 248. – P. 189–194.

43. Davies, K.J.A. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes / K.J.A. Davies, A.L. Goldberg // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262. – P. 8220–8226.
44. Шебеко, В.И. Редокс-регуляция характера фенотипа эндотелиоцитов: от хаоса к порядку / В.И. Шебеко // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2002. – Т. 1, №1. – С. 30–38.
45. Blanco, R.A. Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasma / R.A. Blanco [et. al.] // J. Clin. Nutr. – 2007. – Vol. 86, № 4. – P. 1016–1023.
46. Nakashima I. Redox mechanism as alternaive to ligand binding for receptor activation delivering disregulated cellular signals / I. Nakashima [et. al.] // J. Immunol. – 1994. – Vol. 152. – P. 1064–1071.

Г Л А В А 12. БИОХИМИЯ МЕЛАТОНИНА

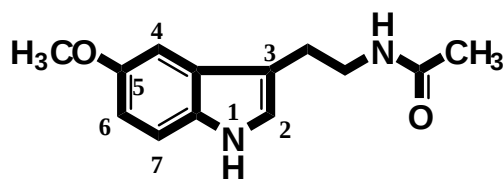
Мелатонин, основной гормон эпифиза (шишковидного тела мозга, пинеальной железы), был открыт американским дерматологом Аароном Лернером (Aaron B. Lerner), занимавшимся изучением природы витилиго (*нарушением пигментации на отдельных участках кожи*). В 1953 году Лернеру удалось получить из бычьих эпифизов экстракт, осветляющий кожу лягушки. Для выделения активного компонента экстракта Лернером и его коллегами было переработано 250 тысяч эпифизов. Действующее вещество было идентифицировано как N-ацетил-5-метокситриптамиин, который Лернер назвал «мелатонином» (от греческих слов *melas* – черный и *tosos* – труд). Результаты многолетней работы были опубликованы в 1958 году в Journal of American Chemical Society [1].

В настоящее время мелатонин обнаружен в растениях, грибах, бактериях, одноклеточных организмах, а также у беспозвоночных и позвоночных животных, включая человека [2]. У млекопитающих мелатонин участвует в регуляции центральной и автономной нервных систем, эндокринных органов и иммунной системы, а также выступает в качестве мощного эндогенного антиоксиданта [2, 3].

Мелатонин может регулировать внутриклеточные процессы непосредственно, минуя систему рецепторов и сигнальных молекул, либо взаимодействуя со специализированными рецепторами. Различают мембранные и ядерные рецепторы мелатонина [3]. У млекопитающих имеется два типа мембранных рецепторов – MT₁ (MTNR1A), обнаруженный в клетках передней доли гипофиза и супрахиазматических ядер гипоталамуса, а также в клетках многих периферических органов, и MT₁ (MTNR1B), присутствующий в некоторых других участках мозга, в сетчатке и в легких. MTNR1A и MTNR1B относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белками. У птиц, амфибий и рыб имеется третий тип рецептора – MT₃ (MTNR1C), который у человека на настоящий момент не идентифицирован.

Ядерные рецепторы мелатонина (ретиноидные рецепторы Za (RZRa) и Zb (RZRb)) относятся к суперсемейству так называемых орфановых рецепторов, физиологические лиганды для которых остаются неизвестными. Полагают, что через ядерные рецепторы опосредуются многие иммуностимулирующие и противоопухолевые эффекты мелатонина.

Физико-химические свойства мелатонина. Мелатонин по химической структуре представляет собой индоламин, содержащий индольный гетероцикл с 5-метокси и 3-этилацетамидной группами.



Атом азота в составе гетероцикла увеличивает электронную плотность на атомах углерода как в пиррольной, так и, до некоторой степени, в фенильной части молекулы, что во многом определяет физико-химические свойства мелатонина и его способность нейтрализовать свободные радикалы. Замена азота на кислород приводит к существенному снижению антиоксидантной активности бензофуранового аналога мелатонина [4].

Боковые цепи вносят значительный вклад в способность мелатонина обезвреживать свободные радикалы, а также ограничивать его прооксидантные свойства. Кроме того, метокси и амидная группы обеспечивают амфифильность мелатонина, позволяющую ему преодолевать клеточные мембраны и морфофизиологические барьеры: гематоэнцефалический барьер и плаценту.

Биосинтез мелатонина. Выделяют два вида мелатонина: синтезируемый в эпифизе, а затем секретируемый в кровоток и экстрапинеальный. Возможность продукции мелатонина вне эпифиза была доказана российскими учеными Н.Т. Райхлиным и И.М. Кветным. В 1974 году ими было установлено, что мелатонин синтезируется в энтерохромаффинных клетках аппендикса [5]. Клетки, продуцирующие мелатонин, в последующем были обнаружены в других отделах желудочно-кишечного тракта, в нейроэндокринных клетках воздухоносных путей, в корковом слое почек и вдоль границы между корковым и мозговым слоем надпочечников, в поджелудочной железе, щитовидной железе, тимусе, мозжечке, мочеполовой системе, сетчатке глаза, плаценте и коже. Кроме этого экстрапинеальный мелатонин выявлен в неэндокринных клетках: тучных клетках, лимфоцитах, эозинофильных лейкоцитах, тромбоцитах, эндотелиоцитах [6, 7].

Такое широкое распространение мелатонина отражает его важную роль как межклеточного нейроэндокринного регулятора и координатора многих сложных и взаимосвязанных физиологических процессов.

Вопрос о том, попадает ли экстрапинеальный мелатонин в кровоток или реализует свое биологическое действие непосредственно там, где он синтезируется, до сих пор не решен.

В эпифизе синтез мелатонина осуществляется из L-триптофана, который поступает в пинеалциты из сосудистого русла (рис. 12.1). На первом этапе L-триптофан гидроксилируется митохондриальной негемовой железосодержащей монооксигеназой, триптофангидроксилазой до гидрокситриптофана, который в результате декарбоксилирования, катализируемого цитоплазматической декарбоксилазой ароматических аминокислот, превращается в серотонин. Последний метаболизируется до мелатонина в реакциях ацетилирования и метилирования, катализируемых арилалкиламин (серотонин) N-ацетилтрансферазой и гидрокси O-метилтрансферазой соответственно.

Биосинтез мелатонина в эпифизе подчиняется циркадной ритмике и зависит от освещенности: темнота его стимулирует, а свет, наоборот, подавляет, поэтому максимальный уровень мелатонина в эпифизе и крови человека и животных наблюдается в ночные часы, а минимальный в утренние и дневные. В среднем, в организме взрослого человека за день синтезируется около 30 мг мелатонина [7].

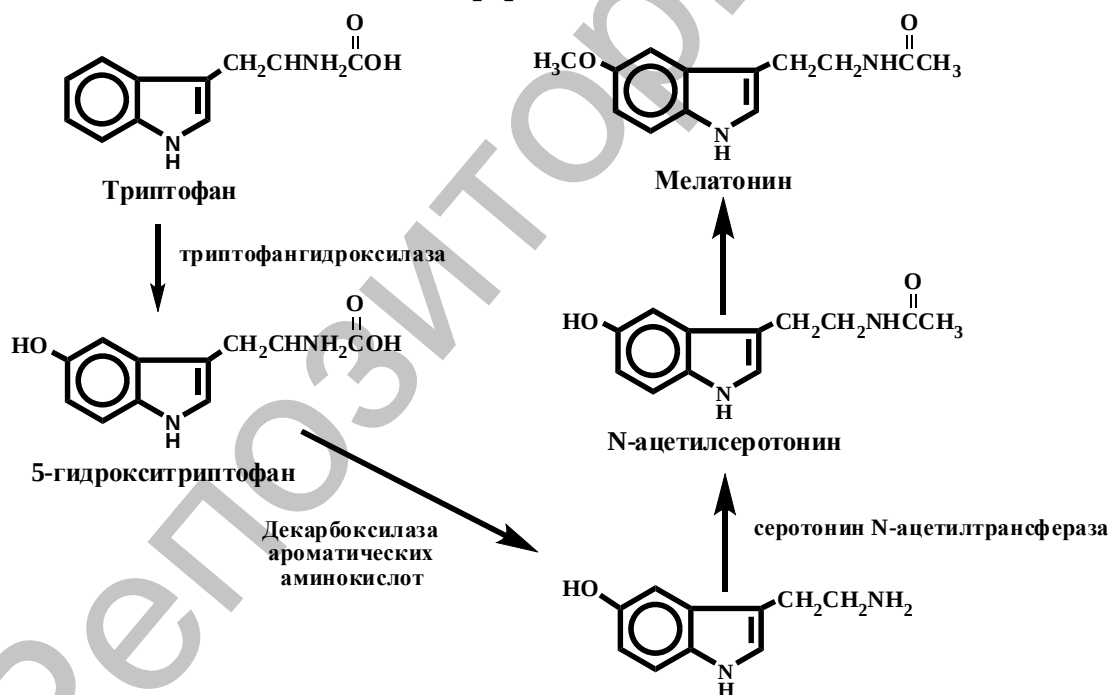


Рис. 12.1. Биосинтез мелатонина.

У млекопитающих световой сигнал от сетчатки глаза передается в эпифиз по нейронам супрахиазматического ядра (СХЯ) гипоталамуса через ствол верхней грудной части спинного мозга и симпатические нейроны верхнего шейного ганглия. В светлое время суток СХЯ активно ингибирует

высвобождение норадреналина из симпатических окончаний. Напротив, в темное время суток сигналы от СХЯ в эпифиз подавляются, что вызывает высвобождение норадреналина из симпатических окончаний. Норадреналин взаимодействует с α_1 и β_1 -адренергическими рецепторами, расположенными на мембране пинеалоцитов. Стимуляция рецепторов, связанных через α -субъединицу Gs-белка с аденилатциклазой, приводит к повышению внутриклеточного уровня цАМФ, что в свою очередь запускает процессы фосфорилирования арилалкиламин N-ацетилтрансферазы – фермента, лимитирующего скорость биосинтеза мелатонина. Посттрансляционная модификация и последующее взаимодействие арилалкиламин N-ацетилтрансферазы с шапероном 14-3-3 обеспечивают ее активацию и стабилизацию [3, 6].

Метаболизм мелатонина. Процесс биотрансформации мелатонина включает в себя несколько альтернативных путей (рис. 12.2). Мелатонин (1) может подвергаться ферментативной деградации до 5-метоксииндолуксусной кислоты (4) или 5-метокситриптофола (5). Кроме того, в результате раскрытия пиррольного кольца в реакции, катализируемой индоламин 2,3-диоксигеназой, мелатонин может трансформироваться в N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамин (8; АФМК). Последний, в свою очередь, после отщепления формильной группы ариламиномформамидазой, превращается в N¹-ацетил-5-метоксикинурамин (9; АМК).

Мелатонин, циркулирующий в кровотоке, метаболизируется в печени благодаря микросомальным цитохромам P450. Продукты реакции, N-ацетилсеротонин (6) и 6-гидроксимелатонин (7), затем выводятся из организма в виде соответствующих сульфатов и глюкуронидов. Полагают, что в печени человека основной вклад в метаболизм мелатонина вносит микросомальный цитохром P450 – CYP1A2 – при минимальном участии CYP2C19 и CYP2C9 [8, 9].

На кафедре биохимии БГУ получены экспериментальные доказательства участия в метаболизме мелатонина не только микросомальных, но и митохондриальных цитохромов P450 печени крыс [10]. Установлено, что в митохондриях и микросомах печени крыс образуется 6 метаболитов мелатонина, 4 из которых идентифицированы как N-ацетилсеротонин, 2-гидроксимелатонин, 6-гидроксимелатонин и N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамин (рис. 12.3). В метаболизм мелатонина в митохондриях печени крыс кроме CYP1A2 вовлечены дополнительно CYP3A и CYP2E1, в то время как CYP3A и CYP2C6 отвечают главным образом за метаболизм мелатонина в микросомах печени.

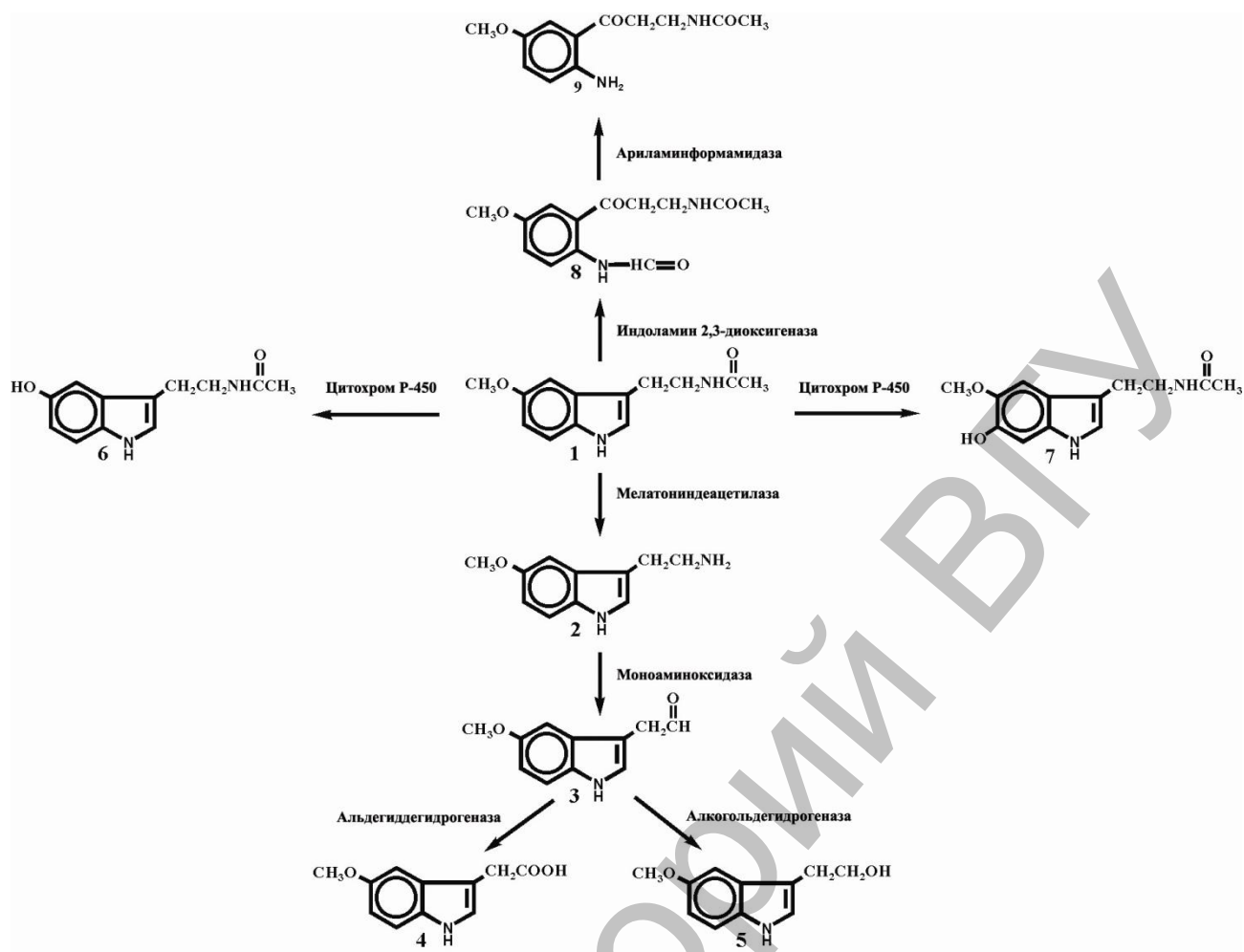


Рис. 12.2. Основные пути метаболизма мелатонина.

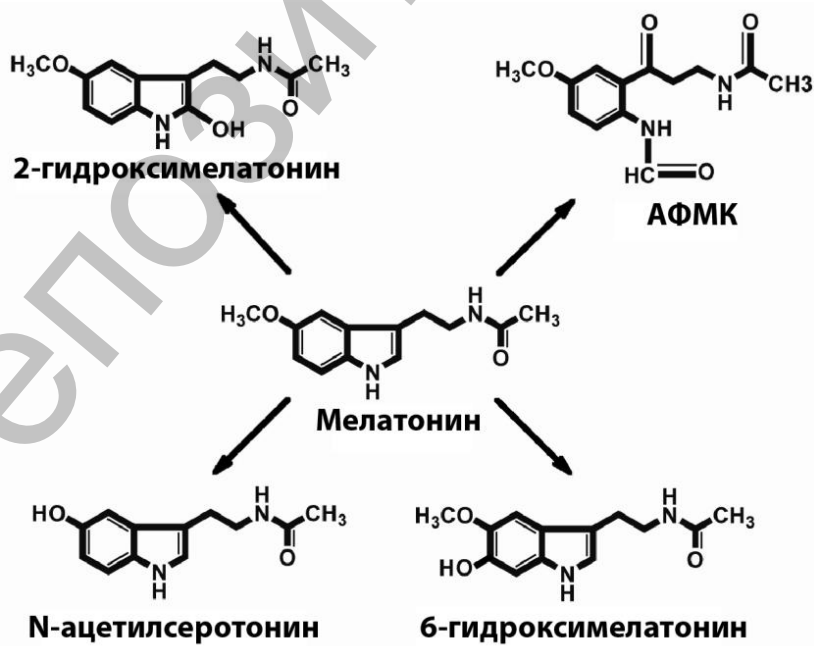


Рис. 12.3. Биотрансформация мелатонина микросомальными и митохондриальными цитохромами Р450 печени крыс.

Сравнительно недавно было обнаружено, что мелатонин может окисляться различными гемопротеинами: пероксидазой хрена, оксиферрилгемоглобином, миелопероксидазой и цитохромом *c* [2, 11]. Особый интерес в этом плане представляет цитохром *c*. Цитохром *c* является частью электронтранспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, однако, подобно большинству гемсодержащих белков, проявляет псевдопероксидазную активность и в присутствии H_2O_2 способен окислять глутатион, аскорбат и НАДН. Псевдопероксидазное окисление мелатонина цитохромом *c* до N^1 -ацетил- N^2 -формил-5-метоксикинурамина и N^1 -ацетил-5-метоксикинурамина проходит через последовательное образование в качестве основных интермедиатов 2-гидроксимелатонина и 2,3-дигидроксимелатонина (рис. 12.4).

В настоящее время получены данные, подтверждающие высокую вероятность реакции псевдопероксидазного окисления мелатонина цитохромом *c* в условиях *in vivo*. АФМК и 2-гидроксимелатонин были обнаружены в эпифизе и митохондриях сердца крыс [11]. Образование данных метаболитов наблюдалось также в условиях экспериментального окислительного стресса, индуцированного в митохондриях сердца гидропероксидом трет-бутила. При замене митохондрий на лишенные цитохрома *c* митопласты, выход продуктов окисления в этих же условиях существенно снизился, что указывает на участие данного гемопротеина в окислении мелатонина в условиях окислительного стресса.

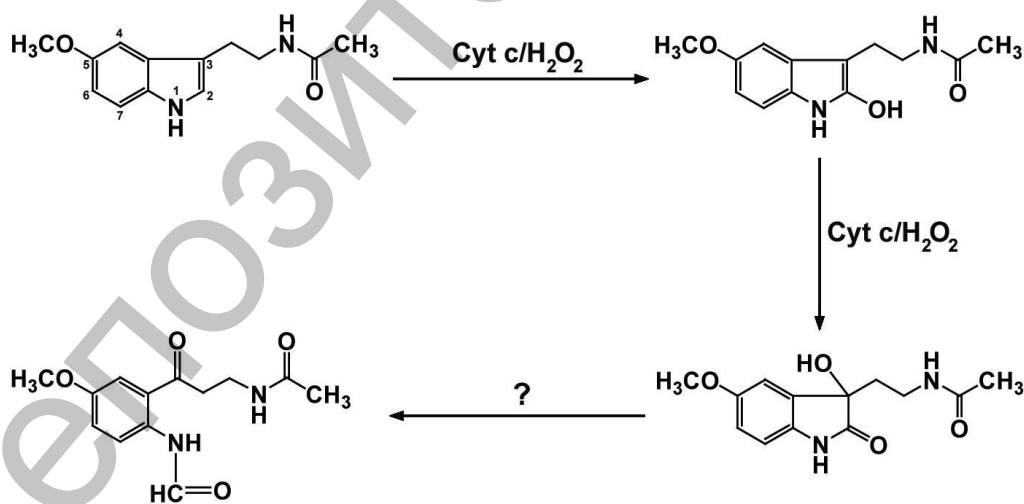


Рис. 12.4. Окисление мелатонина в системе цитохром *c*/ H_2O_2 .

Реакция псевдопероксидазного окисления мелатонина, катализируемая цитохромом *c*, вызывает интерес с точки зрения топологии образования АФК и локализации ферментов, их обезвреживающих. В митохондриях сердца обнаружена каталаза, однако ее активность невысока и, по-види-

тому, данный фермент не играет существенной роли в элиминации пероксида водорода, генерируемого митохондриями в условиях окислительного стресса [12]. Предполагается, что основным ферментом, обеспечивающим детоксикацию H_2O_2 в митохондриальном матриксе, является глутатионпероксидаза [13]. Вместе с тем, в литературе не описаны ферментные системы межмембранного пространства, отвечающие за элиминацию H_2O_2 , который может либо диффундировать из матрикса митохондрий, либо образовываться в результате спонтанной или ферментативной (межмембранная Cu , Zn -СОД обнаружена в митохондриях печени) дисмутации супероксиданион радикала, генерируемого комплексом III [14]. В этой связи псевдопероксидазное окисление мелатонина, с одной стороны, может рассматриваться в качестве альтернативного механизма элиминации H_2O_2 , компенсирующего отсутствие классических систем детоксикации пероксида водорода в межмембранном пространстве, с другой – может выступать в качестве фактора, препятствующего накоплению оксоферрицитохрома c ($\text{Cyt } c^{+\bullet} \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) (рис. 12.5).

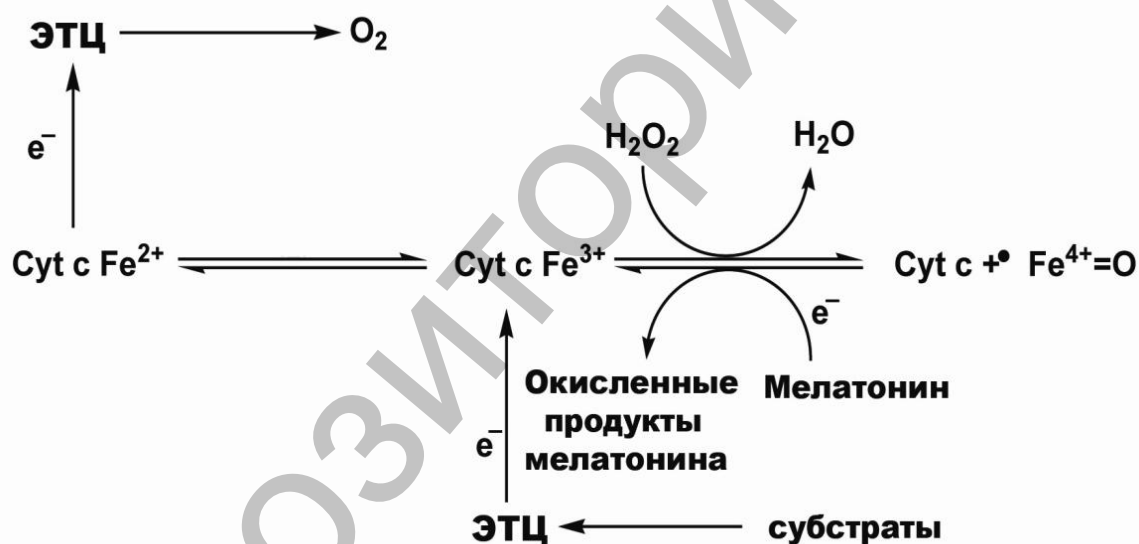


Рис. 12.5. Гипотетическая схема детоксикации пероксида водорода в межмембранном пространстве с участием мелатонина.

Следует отметить, что в последнее время все больше данных свидетельствует о важной патофизиологической роли данного производного цитохрома c . Оксоферрицитохром c ($\text{Cyt } c^{+\bullet} \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) способен инициировать в митохондриях процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и вести реакции псевдопероксидазного окисления эндогенных субстратов, включая восстановленный глутатион и НАДН. Кроме того, потеря связи железа гема с метионином (Met-80) снижает способность цитохрома c принимать

электрон от цитохрома *c*1 комплекса III, вследствие чего нарушается транспорт электронов между комплексом III и комплексом IV [15].

Благодаря реакции псевдопероксидазного окисления мелатонина обеспечивается восстановление оксоферрицитохрома *c* до феррицитохрома, который может снова эффективно участвовать в транспорте электронов.

Таким образом, при физиологических условиях регуляция содержания мелатонина в митохондриях обеспечивается благодаря цитохром Р450-опосредованным реакциям деметилирования и гидроксирования. При повышенной генерации H_2O_2 митохондриями часть мелатонина может подвергаться реакциям псевдопероксидазного окисления, катализируемым цитохромом *c*.

Лабораторная работа

Псевдопероксидазное окисление мелатонина цитохромом *c*

Гипотеза:

Мелатонин, локализованный в митохондриях, может подвергаться реакциям псевдопероксидазного окисления, катализируемым цитохромом *c*.

Предпосылки:

На возможность псевдопероксидазного окисления мелатонина цитохромом *c* указывают следующие факты:

1. Мелатонин окисляется такими гемопротейнами, как пероксидаза хрена, оксиферрилгемоглобин и миелопероксидаза.

2. Цитохром *c* является частью электронтранспортной цепи митохондрий, однако, подобно большинству гемсодержащих белков, проявляет псевдопероксидазную активность (цитохром *c* в присутствии H_2O_2 способен окислять глутатион, аскорбат и НАДН).

3. Максимальная внутриклеточная концентрация мелатонина обнаружена в митохондриях.

4. Митохондрии являются основным местом генерации H_2O_2 в нефатоцитарных клетках.

Алгоритм анализа:

- Изучение окисления мелатонина цитохромом *c* в условиях *in vitro* и идентификация продуктов окисления.
- Расшифровка механизма окисления.
- Доказательство участия цитохрома *c* в окислении мелатонина в митохондриях.
- Обнаружение эндогенных продуктов окисления мелатонина в митохондриях экспериментальных животных.

Методическая часть:

Коммерческий препарат цитохрома *c* полностью окисляют избытком феррицианида калия, после чего обессоливают на колонке Sephadex G-25, используя в качестве элюирующего раствора 10 мМ Трис-HCl буфер (pH 7,4). Концентрацию феррицитохрома *c* (Fe^{3+}) определяют спектрофотометрически при длине волны 550 нм, учитывая коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{550} = 27700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Пероксид водорода готовят непосредственно перед реакцией, оценивая концентрацию спектрофотометрически с помощью коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Мелатонин окисляют цитохромом *c* в 10 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 0,25 мМ H_2O_2 , 0,1 мМ мелатонина и 0,025 мМ цитохрома *c*³⁺. Реакцию запускают внесением мелатонина или H_2O_2 и регистрируют спектры поглощения в диапазоне длин волн от 220 до 700 нм в течение 30 мин с интервалом в 3 минуты.

Для разделения и идентификации продуктов реакции используют жидкостной хроматограф с масс-спектрометрическим детектором или детектором на базе фотодиодной матрицы. Аликвоту образца (реакционной смеси) объемом 20 мкл наносят на обратнофазную колонку Restec Allure C18 (150×4,6 мм; 5 мкм; 60 ангстрем). Продукты окисления мелатонина элюируют со скоростью 0,75 мл/мин при 40 °С в изократическом режиме мобильной фазой, содержащей 25% ацетонитрила и 0,1% уксусной кислоты. Масс-спектрометрический анализ проводят, используя в качестве источника ионов электроспрей-интерфейс, настроенный на положительную ионизацию. Спектрофотометрическую детекцию осуществляют при длине волны 265 нм.

Результаты и их обсуждение:

Изучение окисления мелатонина цитохромом *c* в условиях *in vitro* и идентификация продуктов окисления. Анализ реакционной смеси с помощью обратнофазной хроматографии показывает, что мелатонин окисляется в системе цитохром *c*/ H_2O_2 с образованием пяти продуктов со временем удерживания (RT) 2,45; 3,43; 3,72; 4,28 и 4,78 мин (рис. 12.6).

Масса Продукта 1 (RT 2,45 мин) равна 264 (молекулярный ион $[\text{M}+\text{H}]^+$ с $m/z = 265$), что соответствует введению 2 атомов кислорода в структуру мелатонина. Отсутствие фрагмента с $m/z = 178$, характерного для N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамина (АФМК), указывает на целостность пиррольного кольца данного соединения. Одновременно с этим обнаруживается фрагмент с $m/z = 247$, образованный в результате потери воды молекулярным ионом ($[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$). Эти данные свидетельствуют о том, что Продукт 1 соответствует мелатонину, гидроксильно-

му по двум разным положениям, по-видимому, 2 и 3, так как расходование в ходе реакции Продукта 2 (идентифицированного как 2-гидроксимелатонин) сопровождается одновременным накоплением Продукта 1 и Продукта 4 (идентифицированного как АФМК). Поскольку АФМК образуется в результате раскрытия пиррольного кольца после гидроксилирования мелатонина по 2 и 3 положениям, Продукт 1 является интермедиатом между 2-гидроксимелатонином и АФМК.

Продукт 2 с RT 3,43 мин имеет молекулярную массу 248 (молекулярный ион $[M+H]^+$ с $m/z = 265$), указывающую на моногидроксипроизводное мелатонина.

Масс-спектр соединения содержит также ион с $m/z = 231$, образующийся в результате потери воды молекулярным ионом ($[(M-H_2O)+H]^+$). Продукт 2 имеет спектр поглощения, отличающийся от такового 6-гидроксимелатонина ($\lambda_{\max}=300,6$ нм) и 4-гидроксимелатонина ($\lambda_{\max}=308$ и 238 нм). В то же время спектр поглощения Продукта 2 ($\lambda_{\max}=296$ и 257 нм) совпадает с таковым кето таутомера 2-гидроксимелатонина ($\lambda_{\max}=298$ и 258 нм).

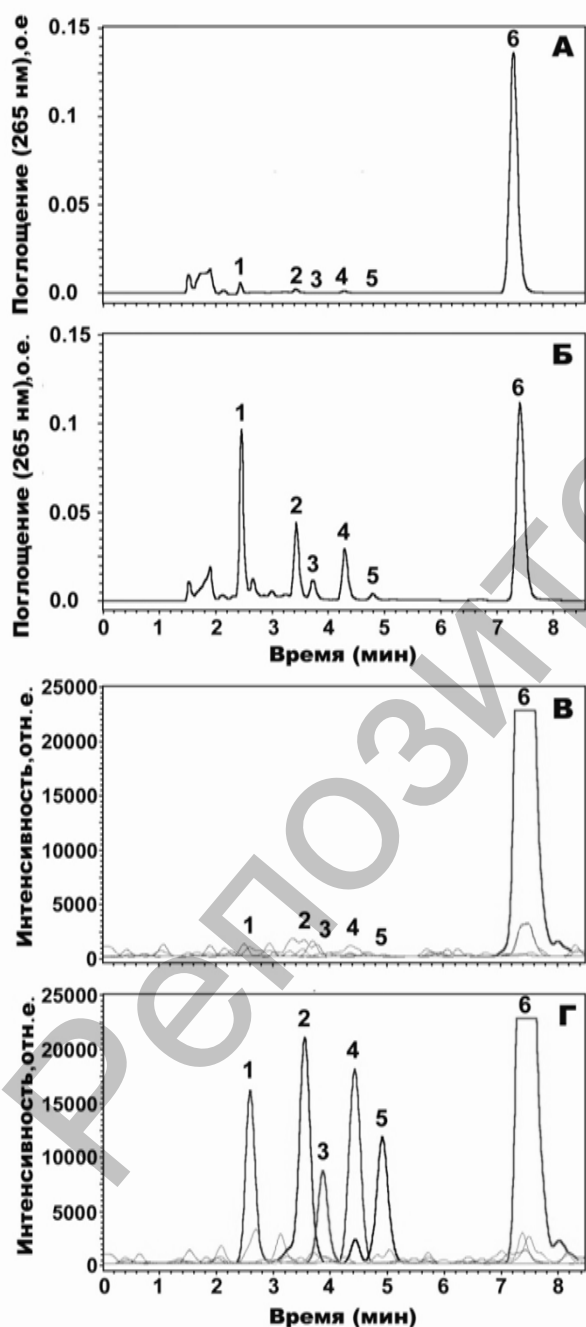


Рис. 12.6. Анализ продуктов окисления мелатонина цитохромом *c* с помощью обратнофазной хроматографии и масс-спектрометрии. Хроматографический профиль элюции (А) и масс-хроматограмма (Б) реакционной смеси, содержащей мелатонин и H_2O_2 без цитохрома *c*. Хроматографический профиль элюции (В) и масс-хроматограмма (Г) реакционной смеси, содержащей мелатонин и H_2O_2 и цитохром *c*. На рисунке приведены масс-хроматограммы ионов с $m/z=265$; $m/z=249$; $m/z=479$; $m/z=237$; $m/z=233$. Пики, обозначенные как 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответствуют 2,3-дигидроксимелатонину, 2-гидроксимелатонину, димеру мелатонина с гидроксимелатонином, N^1 -ацетил- N^2 -формил-5-метоксикинурамину (АФМК), N^1 -ацетил-5-метоксикинурамину (АМК) и мелатонину.

Таким образом, данные спектрофотометрического и масс-спектрометрического анализов указывают на то, что Продукт 2 является 2-гидроксимелатонином.

Инкубация очищенного Продукта 2 с цитохромом *c* и пероксидом водорода приводит к образованию Продукта 1 (2,3-дигидроксимелатонин), доказывая, что 2-гидроксимелатонин и 2,3-дигидроксимелатонин являются интермедиатами между мелатонином и АФМК.

Продукт 3 с RT 3,72 мин имеет молекулярную массу 478 (молекулярный ион $[M+H]^+$ с $m/z = 479$), соответствующую димеру, образованному остатками мелатонина и гидроксимелатонина ($[(\text{мелатонин (MW 232)} + \text{кетотаутомер 2-гидроксимелатонина (MW 248)}) - 2H] + H]^+$).

Продукт 4 с RT 4,28 мин имеет основной молекулярный ион $[M+H]^+$ с $m/z = 265$, указывающий на добавление двух атомов кислорода к молекуле мелатонина, а также минорный фрагмент с $m/z = 178$. Спектрофотометрические и масс-спектрометрические характеристики Продукта 4 идентичны таковым N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамина (АФМК).

Продукт 5 с RT 4,78 мин имеет основной молекулярный ион $[M+H]^+$ с $m/z = 237$ и идентифицирован как N¹-ацетил-5-метоксикинурамин (АМК) – производное АФМК, лишенное формильной группы.

Расшифровка механизма окисления. Окисление мелатонина в системе цитохромом *c*/H₂O₂ сопровождается изменением спектров поглощения как мелатонина, так и цитохрома *c* (рис. 12.7).

Уменьшение поглощения при 408 нм свидетельствует об раскрытии порфиринового кольца при взаимодействии H₂O₂ с цитохромом *c*, а также в ходе окисления мелатонина. Вместе с тем, освобождающееся при деградации гема железо не играет существенной роли в катализе окислительных процессов, что подтверждается отсутствием каких-либо эффектов, вызываемых внесением в среду хелатора (диэтилентриаминпентауксусная кислота).

Предварительная инкубация феррицитохрома (cyt *c*-Fe^{III}) с имидазолом приводит к ингибированию реакции окисления мелатонина (вставка, рис. 12.7). Имидазол, связываясь с железом гема, замещает метионин (Met-80), занимающий шестое координационное место, препятствуя тем самым образованию оксиферрильного производного гема. Данный феномен доказывает участие гема в окислении мелатонина цитохромом *c*.

В пользу образования оксиферрильного производного цитохрома *c* (Cyt *c*^{+•} Fe^{IV}=O) свидетельствует исчезновение хромофора при 695 нм при инкубации гемопротейна в присутствии пероксида водорода (рис. 12.8). Известно, что нативный цитохром *c* имеет слабый максимум поглощения при 695 нм, который уменьшается в случае потери связи железа с метионином Met-80.

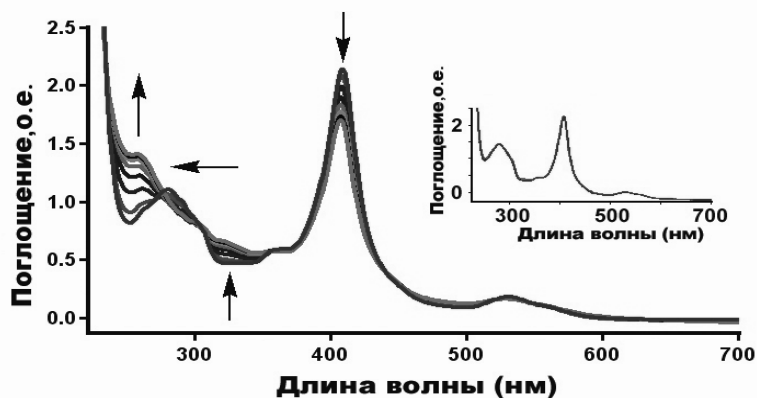


Рис. 12.7. Спектрофотометрический анализ реакции окисления мелатонина цитохромом *c*. Стрелками обозначены направления спектральных изменений. Вставка: влияние имидазола на окисление мелатонина цитохромом *c*.

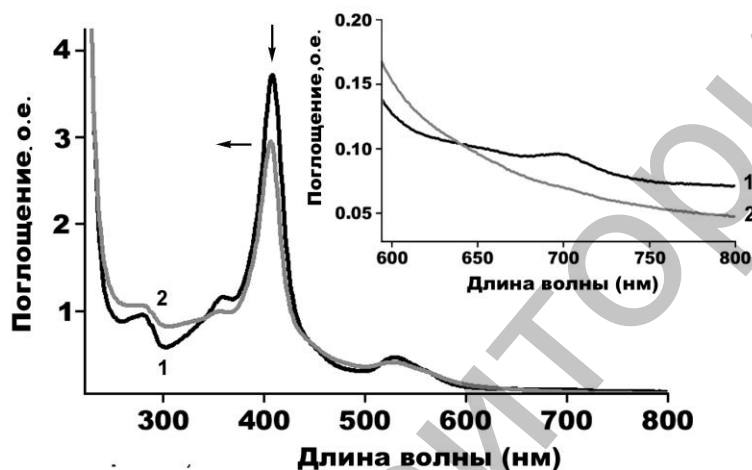
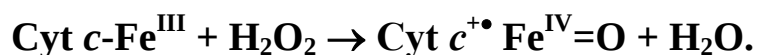


Рис. 12.8. Изменение спектра поглощения цитохрома *c* после добавления в инкубационную среду H_2O_2 . Спектр поглощения цитохрома *c* в отсутствии (1) и в присутствии H_2O_2 (2). На вставке приведен увеличенный фрагмент спектра поглощения цитохрома до (1) и после (2) внесения H_2O_2 . Цитохром *c* инкубировали с H_2O_2 в течение 30 минут при 37°C .

($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$), второй в виде π радикала порфирина:



Мелатонин при взаимодействии с оксоферрильным гемом цитохрома *c* ($\text{Cyt } c^{+\bullet} \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) в результате одноэлектронного окисления превращается в катион-радикал; $\text{Cyt } c^{+\bullet} \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ при этом восстанавливается до $\text{Cyt } c$

Предполагается, что образование изводных мелатонина при его взаимодействии с сильными оксидантами протекает через образование интермедиата – резонансно стабилизированного и относительно долгоживущего катион-радикала мелатонина. Учитывая это, а также то, что превращение мелатонина в АФМК проходит через образование в качестве интермедиатов 2-гидроксимелатонина и 2,3-дигидроксимелатонина можно предложить следующую схему псевдопероксидазного окисления мелатонина цитохромом *c* (рис. 12.9).

В результате взаимодействия феррицитохрома *c* (Fe^{III}) с пероксидом водорода образуется оксоферрильное производное гемопротейна ($\text{Cyt } c^{+\bullet} \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$), которое подобно Соединению I пероксидаз, содержит 2 окислительных эквивалента. Первый в виде оксоферрильного гема

$\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. Неферментативное присоединение OH^- к катион-радикалу мелатонина приводит к образованию гидроксилированного по С2 положению аддукта индоламина. В свою очередь, в результате окисления последнего $\text{Cyt } c \text{ Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ образуется $\text{Cyt } c\text{-Fe}^{\text{III}}$ и кето таутомер 2-гидроксимелатонина. Окисление последнего новой молекулой $\text{Cyt } c^{+\bullet} \text{ Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ сопровождается образованием катион-радикала индольного типа, который после неферментативного добавления OH^- трансформируется в 2,3-дигидроксимелатонин. Последний, выйдя из субстрат-связывающего центра в раствор, окисляется $\text{Cyt } c^{+\bullet} \text{ Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ или H_2O_2 и в результате раскрытия индольного кольца превращается в АФМК.

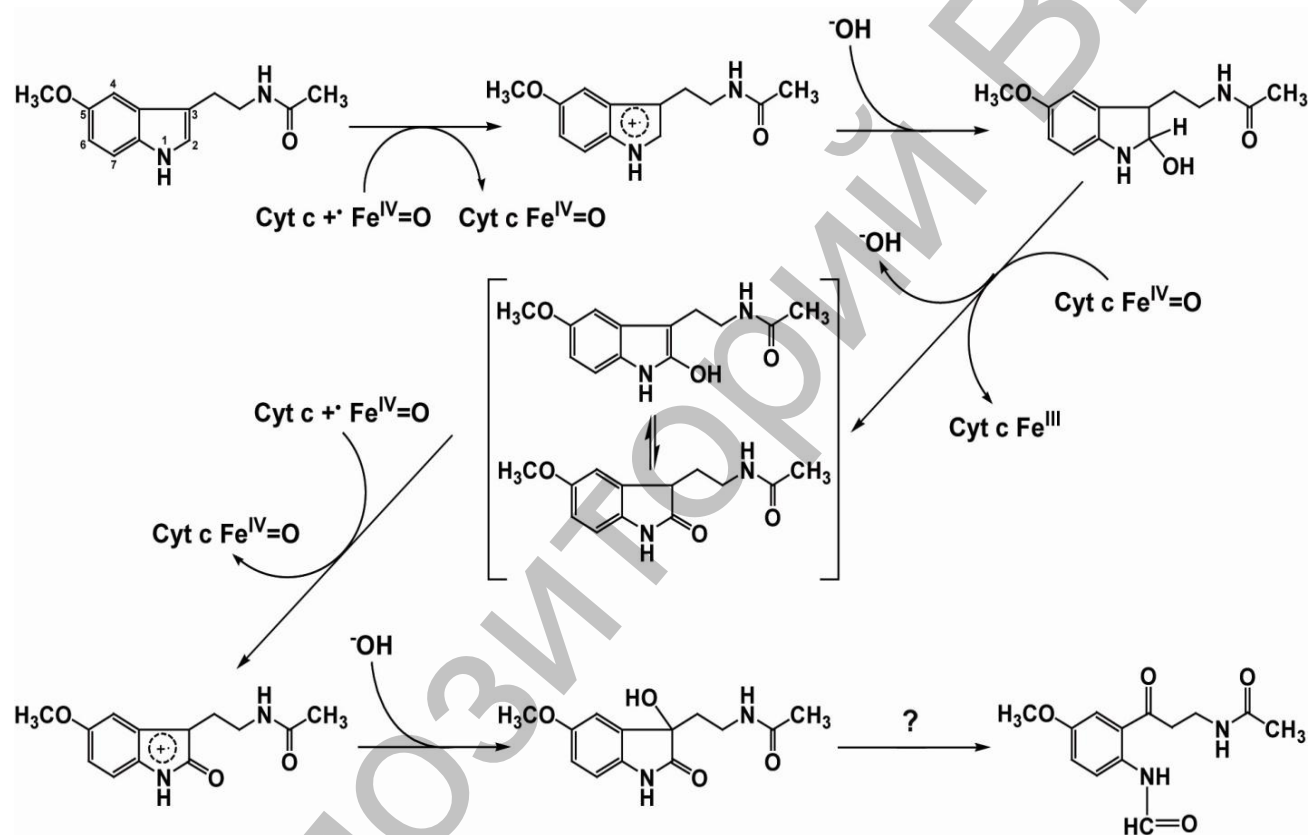


Рис. 12.9. Предполагаемая схема псевдопероксидазного окисления мелатонина цитохромом *c*.

Отсутствие в ходе реакции каких-либо спектральных изменений, свидетельствующих о восстановлении феррицитохрома (Fe^{III}) до ферроцитохрома *c* (Fe^{II}) (увеличение поглощения при 550 нм), косвенно подтверждает предложенную схему (рис. 12.8).

Доказательство участия цитохрома *c* в окислении мелатонина в митохондриях. Инкубация мелатонина с митохондриями сердца, обработанными гидропероксидом трет-бутила, сопровождается образованием продуктов окисления мелатонина: 2-гидроксимелатонина и АФМК

(рис. 12.10). При замене митохондрий на лишенные цитохрома с митопласты выход продуктов окисления в этих же условиях существенно снизился, что указывает на участие данного гемопротеина в окислении мелатонина.

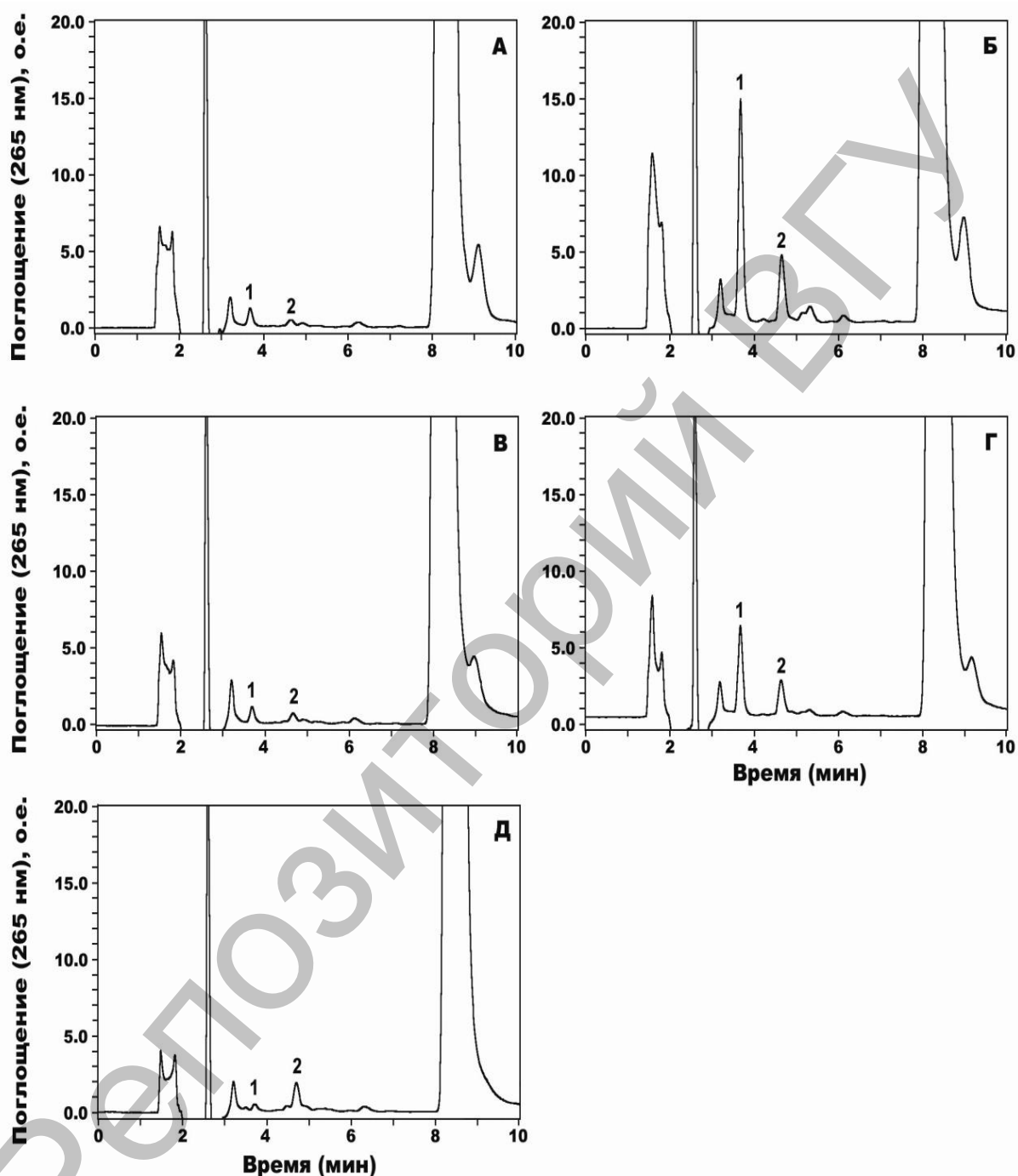


Рис. 12.10. Окисление мелатонина в митохондриях и митопластах сердца, обработанных гидропероксидом трет-бутила. А – мелатонин инкубировался с митохондриями без гидропероксида трет-бутила; Б – мелатонин инкубировался с митохондриями в присутствии гидропероксида трет-бутила; В – мелатонин инкубировался с митопластами без гидропероксида трет-бутила; Г – мелатонин инкубировался с митопластами в присутствии гидропероксида трет-бутила; Д – мелатонин инкубировался с гидропероксидом трет-бутила без митохондрий или митопластов. 1 – 2-гидроксимелатонин; 2 – АФМК.

Обнаружение эндогенных продуктов окисления мелатонина в митохондриях экспериментальных животных. Эндогенные мелатонин и N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамин обнаружены в митохондриях сердца самцов белых крыс, что подтверждает высокую вероятность реакций псевдопероксидазного окисления мелатонина *in vivo* (рис. 12.11).

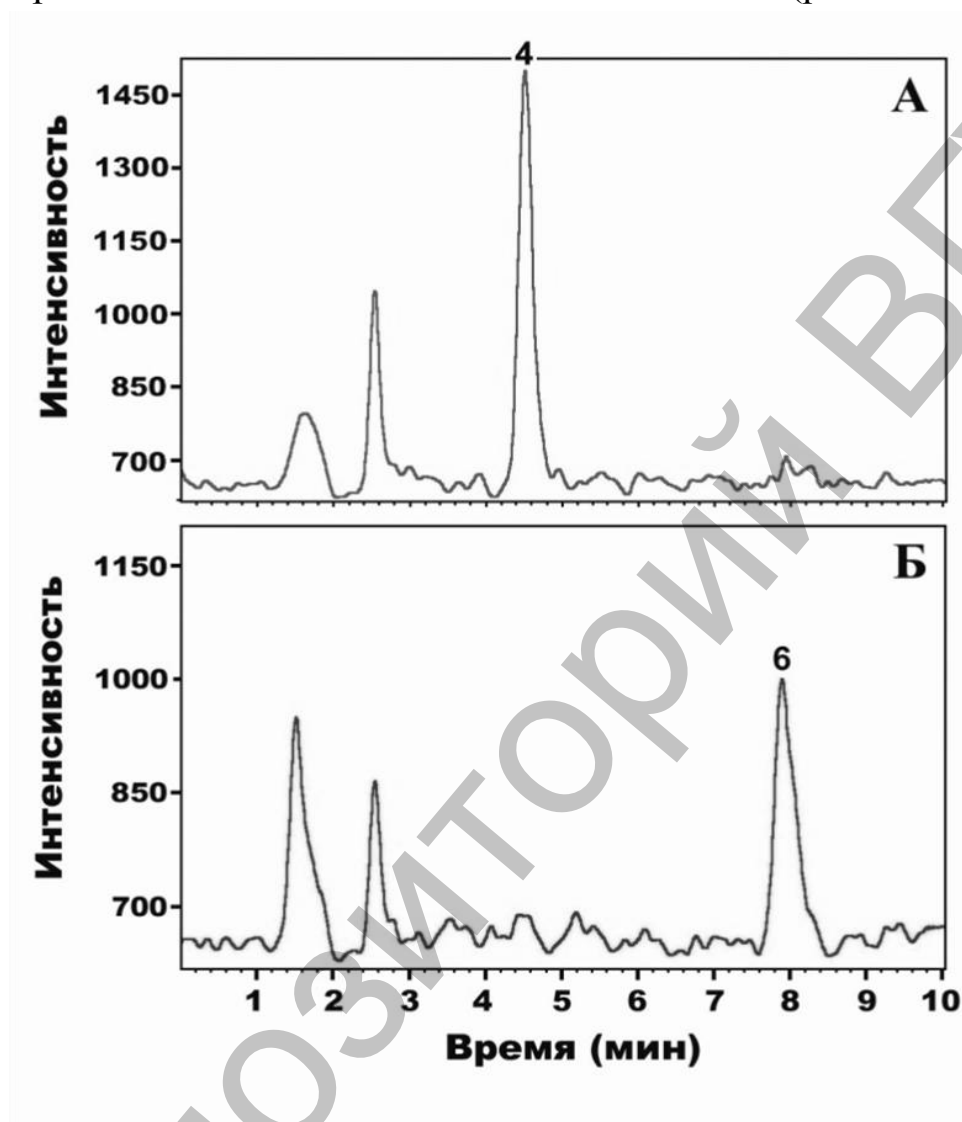


Рис. 12.11. Детекция эндогенного мелатонина и N¹-ацетил-N²-формил-5-метокси-кинурамина в митохондриях сердца самцов белых крыс с помощью LC-MS. Масс-спектрометрическая детекция осуществлялась в режиме мониторинга отдельных ионов [M+H]⁺ с соотношением масса/заряд 265 (А) и 233 (Б). 4 – N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамин; 6 – мелатонин.

Выводы. Мелатонин в присутствии цитохрома с и H₂O₂, а также в митохондриях, обработанных гидропероксидом трет-бутила, окисляется до N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамина и N¹-ацетил-5-метоксикинурамина. Реакция протекает по псевдопероксидазному пути через последовательное образование в качестве основных интермедиатов 2-гидроксимелатонина и 2,3-дигидроксимелатонина. Эндогенный N¹-ацетил-N²-

формил-5-метоксикинурамин обнаружен в митохондриях сердца крыс, что подтверждает высокую вероятность реакций псевдопероксидазного окисления мелатонина *in vivo*.

Контрольные вопросы

1. Какую биологическую роль играет мелатонин?
2. Каковы пути биосинтеза мелатонина?
3. Каковы пути метаболизма мелатонина?
4. Каков механизм участия мелатонина в окислительных процессах?

Литература

1. Lerner, A.B. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes / A.B. Lerner [et. al.] // J. Am. Chem. Soc. – 1958. – Vol. 80, № 10. – P. 2587.
2. Tan, D.X. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness / D.X. Tan [et. al.] // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. – 2010. – Vol. 85, № 3. – P. 607–623.
3. Hardeland, R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent / R. Hardeland // Biofactors. – 2009. – Vol. 35, № 2. – P. 183–192.
4. Tan, D.X. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger / D.X. Tan [et. al.] // Curr. Top. Med. Chem. – 2002. – Vol. 2, № 2. – P. 181–197.
5. Райхлин, Н.Т. Биологическая идентификация мелатонина в энтерохромаффинных клетках / Н.Т. Райхлин, И.М. Кветной // Доклады АН СССР. – 1974. – Т. 215, № 3. – С. 731–732.
6. Hardeland, R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites / R. Hardeland // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – Vol. 65, № 13. – P. 2001–2018.
7. Анисимов, В.Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике / В.Н. Анисимов. – СПб.: Изд-во «Система». – 2007. – 40 с.
8. Facciola, G. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes / G. Facciola [et. al.] // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2001. – Vol. 56. – P. 881–888.
9. Ma, X. Metabolism of melatonin by human cytochromes P450 / X. Ma [et. al.] // Drug Metab. Dispos. – 2005. – Vol. 33. – P. 489–494.

10. Semak, I. Metabolism of melatonin by cytochrome P450s in rat liver mitochondria and microsomes / I. Semak [et. al.] // J. Pineal. Res. – 2008. – Vol. 45, № 4. – P. 515–523.
11. Semak, I. A novel metabolic pathway of melatonin: oxidation by cytochrome C / I. Semak [et. al.] // Biochemistry. – 2005. – Vol. 44, № 26. – P. 9300–9307.
12. Antunes, F. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions / F. Antunes [et. al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – Vol. 33. – P. 1260–1267.
13. Cadenas, E. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging / E. Cadenas, K.J. Davies // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 29. – P. 222–230.
14. Okado-Matsumoto, A. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria / A. Okado-Matsumoto, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 38388–38393.
15. Chen, Y.R. Protein oxidation of cytochrome C by reactive halogen species enhances its peroxidase activity / Y.R. Chen [et. al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 29781–29791.

Г Л А В А 13. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ L-АСПАРАГИНАЗЫ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА МЕХАНИЗМА ИХ ДЕЙСТВИЯ

Ферменты представляют собой уникальные лекарственные средства, используемые в медицине для лечения заболеваний различной этиологии, что в первую очередь связано с их высокой специфичностью и мощным воздействием на различные стороны метаболизма в организме.

L-аспарагиназа (АСП, L-аспарагин-аминогидролаза; КФ 3.5.1.1.), относящаяся к треониновым аминоксидогидролазам, катализирует гидролитическое расщепление L-аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака и с меньшей скоростью гидролиз L-глутамината. Причем степень дезаминирования этих аминоксидов сильно зависит от концентрации АСП в сыворотке крови. Интересно, что степень дезаминирования глутамината оказалась независимым параметром, определяющим снижение уровня аспарагина после действия АСП. Более того, высокий уровень глутамината в крови способствовал возобновлению синтеза аспарагина в печени.

АСП представляет собой олигомерный фермент – тетрамер, состоящий из ковалентно не связанных между собой мономеров с молекулярной массой 32 kDa. Фермент включает четыре идентичных активных центра. Мономер АСП не обладает каталитической активностью, поскольку активный сайт фермента формируется при образовании димера и расположен с внешней стороны молекулы. Хотя димер имеет все структурные элементы для катализа, принято считать, что ферментативной активностью обладает только тетрамер.

Аспарагиназы – это уникальные по механизму противоопухолевого действия ферменты, которые как противоопухолевые препараты в течение более 30-ти лет относятся к обязательным компонентам программ химиотерапии острого лимфобластного лейкоза и неходжкинских лимфом высокой степени злокачественности у детей. Недавно получены результаты фармакогенных и фармакопротеомных исследований, указывающие на возможность использования АСП для лечения солидных опухолей человека при использовании аспарагинсинтазы в качестве маркера для селекции больных [1, 2].

История изучения этого фермента насчитывает уже более 100 лет. В 1904 году Ланг обнаружил АСП в тканях животных, а Шибата нашел в экстрактах из грибов фермент, катализирующий гидролиз аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака. Последующие работы показали, что АСП широко распространена у растений, микроорганизмов и эукариот.

Исследование противоопухолевого действия АСП было начато более 50-ти лет назад, когда впервые была продемонстрирована редукция лимфомы у мышей, которым вводили сыворотку, приготовленную из крови морских свинок. В 1960-х годах Брум предположил, что АСП, находящаяся в сыворотке крови морских свинок, эффективна против опухолевых клеток лимфоидной ткани.

Окончательные доказательства противоопухолевого действия АСП были представлены после выделения АСП с помощью иммуноэлектрофореза. Но наиболее простым, экономичным и удобным методом было признано получение АСП из бактерий. Позднее было обнаружено, что *E. coli* продуцирует АСП, ингибирующую рост лимфоидных опухолей, в то время как другие бактерии продуцируют менее активные либо неактивные формы АСП.

Целью терапии АСП является длительное поддержание достаточного для полного расщепления аспарагина уровня ферментативной активности АСП в крови пациентов. Поэтому разовая доза препарата должна быть такой, чтобы создавался необходимый уровень активности АСП до следующего введения препарата.

Помимо величины аспарагиназной активности важнейшей фармакологической характеристикой АСП является продолжительность времени полувыведения. У разных АСП он существенно различается (от 7,2 до 137,5 часов) и зависит от скорости их расщепления протеиназами крови и от скорости образования антител, инактивирующих АСП.

Кроме протеиназ крови АСП могут разрушать две протеиназы – катепсин В, который продуцируют нормальные и лейкозные клетки крови и который деградирует АСП, полученные из *Escherichia coli* и *Erwinia chrysanthemi*, и аспарагинил эндопептидаза (АЭП), экспрессируемая в периферических лизосомах лимфобластов. Определен сайт из 24-х аминокислотных остатков (N24) в гибкой петле молекулы АСП, который прежде всего расщепляет АЭП. Причем АЭП не только инактивирует АСП, но при этом способна потенцировать процессинг антигена, приводящего к аллергической реакции. В данном случае открыт еще один механизм резистентности к АСП, которую предлагается преодолеть единственной модификацией аминокислотного остатка в сайте N24.

Механизм противоопухолевого действия АСП заключается в расщеплении аспарагина, находящегося именно во внеклеточном пространстве, откуда получают его лейкемические лимфобласты, миелобласты и целый ряд клеток других опухолей, когда у них, как известно, отсутствует или снижена способность к синтезу собственного аспарагина, т.е. отсутствует или снижена экспрессия фермента аспарагинсинтетазы (АС). В то же время

большинство здоровых, в том числе гемопоэтических, клеток способно синтезировать собственный АСН. Это определяет минимальное миелотоксическое действие АСП [3].

Таким образом, для опухолевых лимфобластов аспарагин является незаменимой аминокислотой, без поступления которой в клетку извне резко нарушается синтез белков и клетка становится не способной к дальнейшему делению. Возможно, это связано с тем, что нормальная концентрация аспарагина обеспечивает прохождение клетками G_1 фазы клеточного цикла. Развитие апоптоза, причем очень быстрое, у опухолевых клеток после их обработки АСП в опытах *in vitro* скорее всего связано с культивированием клеток в средах с низким содержанием сыворотки, которая обычно содержит ингибиторы апоптоза.

Важно, что реализация цитотоксичности АСП не подразумевает контакта или проникновения активного вещества в опухолевую клетку, что выводит АСП из-под действия стандартных и работающих против других цитостатиков механизмов клеточной резистентности.

Например, одним из механизмов резистентности опухолевых стволовых клеток является их способность выбрасывать из клеток липофильные вещества и цитотоксические препараты при помощи специальных АТФ-зависимых белков-транспортеров, которые используют энергию АТФ. Если у этих клеток отсутствует собственный синтез аспарагина, они бессильны перед АСП. Таким образом, АСП могут быть использованы для подавления роста тех опухолевых стволовых клеток, у которых отсутствует или крайне низка экспрессия аспарагин синтетазы (АС).

Это подтверждает следующий эксперимент, в котором при снижении содержания аминокислот в крови крыс-опухоленосителей было установлено, что концентрация только двух аминокислот является определяющей интенсивность опухолевого роста – аспарагина и глутамина. При 50%-ной концентрации глутамина и 25%-ной концентрации аспарагина в плазме крови крыс наблюдалось 70%-ное торможение роста опухолевых стволовых клеток саркомы крыс (NTSCA). Снижение концентрации глутамина и аспарагина до 4% и 1% соответственно приводило к 100%-ному торможению роста клеток NTSCA, что говорит об их высокой чувствительности к снижению концентрации этих аминокислот.

Противоопухолевая активность АСП зависит также от наличия или формирования резистентного к ней клона лейкозных клеток, причем последнее происходит после введения АСП.

Главной причиной возникновения резистентности к АСП считается повышенный уровень экспрессии АС в лейкозных клетках. Однако, разви-

тие методов измерения активности АС у пациентов с целью предсказания эффективности терапии АСП позволило выявить несколько устойчивых к АСП клеточных линий с повышенным уровнем экспрессии и/или активностью АС. Иногда чувствительность к АСП и высокая частота ремиссии наблюдается и у больных с повышенным уровнем экспрессии АС. Более того, результаты определения уровня экспрессии мРНК АС у больных В-лимфобластной лейкемией показывают, что экспрессия АС у них не ниже нормы.

В последнее время интенсивное изучение взаимоотношения гемопоэтических стволовых клеток с их микроокружением позволяют предположить еще одну роль АС в развитии лекарственной устойчивости.

В 2007 г. была выдвинута гипотеза о том, что взаимодействие между лейкозными лимфобластами и стволовыми мезенхимальными клетками костного мозга (СМК) создает «нишу» для лейкозных клеток, защищающих их от действия АСП. При проверке этой гипотезы на детях, больных лейкозом, у которых брали для исследования СМК и клетки крови, оказалось, что в клетках СМК после введения пациентам АСП началась более интенсивная экспрессия АС, чем в лейкозных клетках. Устойчивость последних к АСП находилась в прямой зависимости от уровня экспрессии АС СМК. Это открытие определяет новое направление в противолейкозной терапии: через ингибирование активности АС в СМК.

Исследования в этом направлении продолжаются, так, в июне 2010 г. китайские ученые на 8-ми линиях лейкозных клеток (Jurkat, HL-60, U937, NB4, ТНР-1, Namalwa, Kapras299 и K562) исследовали связь между уровнем экспрессии мРНК АС и чувствительностью этих клеток к АСП. Использовали ПЦР в реальном времени и флюоресцентный краситель Eva Green. Им удалось с высокой степенью достоверности ($p \leq 0,05$) определить повышенный уровень экспрессии АС в клетках в ответ на добавление АСП. Клетки, чувствительные к АСП, имели низкую экспрессию АС, а клетки, резистентные к АСП, – высокую. U937 оказались наиболее чувствительными к действию АСП, и у них был самый низкий уровень экспрессии АС, в то же время клетки K562, обычно резистентные к АСП, показали самый высокий уровень АС [4].

Таким образом, АС играет решающую роль в регуляции биологического поведения клетки после резкого снижения концентрации аспарагина, а уровень экспрессии мРНК АС отражает чувствительность клеток к АСП. Полученные результаты дают возможность предложить использование АСП в основном при лейкозах, лейкозные клетки которых обладают низкой экспрессией АС.

В 2009 г. в Японии L-аспарагиназой при добавлении винкристина и преднизолона была излечена женщина 66-ти лет, болевшая острой миелоб-

ластической лейкемией (ОМЛ) с неходжкинской лимфомой. Активность АС в миелобластных клетках была такой низкой, что ее невозможно было определить, что позволило сделать заключение о том, что АСП является эффективным препаратом для лечения ОМЛ, у которых миелобластные клетки не синтезируют АС.

В исследованиях, связанных с применением АСП для онкотерапии, сейчас существует несколько направлений [5].

Это создание новых препаратов АСП, менее токсичных, менее иммуногенных и более активных, а самое главное более стабильных с большим временем полужизни. К последним относится пэгилированная АСП (ПЭГ-АСП), представляющая собой L-аспарагиназу *Escherichia coli*, к которой ковалентно присоединен полиэтиленгликоль, что делает ее менее иммуногенной и пролонгирует время полужизни. Работы по созданию отечественного препарата такой ПЭГ-АСП проводятся в лаборатории медицинской биотехнологии Института биологической и медицинской химии РАМН в Москве.

Далее – это разработка методов преодоления резистентности к АСП. Сюда относится разработка методов оценки экспрессии мРНК АС в клетках опухолей и поиск или синтез ингибиторов активности АС в этих клетках. Очень интересным направлением являются исследования, связанные с использованием МСК больных лейкозом для регуляции роста и апоптоза в лейкозных клетках.

Предлагаются две методики, применяемые в экспериментальной работе при исследовании активности различных L- АСП, – это МТТ-тест и методика определения энзиматической активности L- АСП.

Лабораторная работа **МТТ-тест**

Противоопухолевая активность L-аспарагиназы основана на ее способности резко снижать процессы синтеза белка в опухолевых клетках и тем самым ингибировать их рост в результате снижения концентрации аспарагина в окружающей клетки среде. В случае большой концентрации клеток в лунке они лишены возможности делиться (по принципу контактного торможения роста клеток), поэтому недостаток аспарагина в среде не влияет на их рост, и клетки становятся нечувствительными к действию L-аспарагиназы. Поэтому при тестировании препаратов с подобным механизмом действия для получения адекватного ответа необходимо учитывать плотность клеток в исследуемом образце, и помимо оценки дозовой зависимости противоопухолевой активности определять оптимальное число опухолевых клеток, внесенных в лунку.

Для определения цитотоксичности различных соединений (в том числе и L-аспарагиназ), их способности влиять на жизнеспособность клеток и их рост обычно используется МТТ-тест. Реактив МТТ представляет собой тиазолий синий тетразолий бромид (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-3,5-дифенилформазан).

Метод основан на том, что дегидрогеназы митохондрий только живых клеток конвертируют МТТ в окрашенные кристаллы формазана. Водонерастворимую соль формазана лучше всего растворять в диметилсульфоксиде (DMSO) для измерения оптической плотности раствора: 0,5%-ный раствор МТТ (ДиаЭм) готовят, растворяя навеску МТТ в растворе Хенкса на горячей водяной бане. Перед добавлением к клеткам раствор МТТ охлаждают приблизительно до 37 °С. Флакон с раствором реактива МТТ заворачивают в черную бумагу и хранят в морозильнике.

Для проведения экспериментов по определению цитотоксичности препаратов L-аспарагиназ клетки пассируют в 96-тилуночные планшеты в 100 мкл среды и культивируют в CO₂ -инкубаторе при 37 °С 24 часа. Затем добавляют препараты L-аспарагиназ и через 72 часа останавливают эксперимент.

Для проведения МТТ-теста к культивируемым клеткам добавляют 50 мкл 0,5%-ного раствора МТТ и клетки культивируют еще 3–4 часа при 37 °С. С клеток, растущих в монослое, тщательно удаляют культуральную среду, и кристаллы формазана растворяют в 0,1 мл DMSO при встряхивании на Titramax 101 в течение 10 мин. Клетки, растущие в суспензии, переносят в 96-тилуночные планшеты с коническим дном и осаждают в центрифуге Eppendorf 5810 R при 1000 g 5 мин. Супернатант удаляют, к осадку клеток добавляют 0,1 мл DMSO, и после встряхивания планшетов на Titramax 101 в течение 10 мин. окрашенный раствор DMSO переносят согласно номерам проб в 96-тилуночные планшеты с плоским дном, в которых проводили культивирование и МТТ-реакцию, для того чтобы растворить кристаллы формазана в оставшиеся в лунках клетках. Планшеты опять помещают на Titramax 101 на 10 мин, после этого интенсивность окрашивания измеряют на мультискане («Lab. System», Финляндия) при длине волны 540 нм. Количество выживших клеток рассчитывают в процентах от контроля, которым являются клетки, культивированные без добавления препаратов.

Определение энзиматической активности рекомбинантной L-аспарагиназы

Проводят методом прямой несслеризации. Поскольку аспарагиназа хранится только в лиофилизированном либо в растворе в замороженном состоянии при –20 °С, а при последующем оттаивании теряет часть своей активности, необходимо проводить измерение активности фермента перед

проведением экспериментов по определению ее цитотоксической противоопухолевой активности как *in vivo*, так и *in vitro*.

Метод основан на измерении концентрации аммиака, высвобождаемого при гидролизе L-аспарагина. Одна единица активности фермента соответствует 1 мкмолью аммиака, высвобождаемого за 1 мин инкубации с L-аспарагином при 37 °С и pH 8,5.

Реактивы: При всех приготовлениях растворов и разведениях препаратов используется только деионизованная вода высокого качества.

1. 0,0125 М Na-фосфатный буфер, pH 8,5 (можно использовать 0,0125 М Na-боратный буфер, pH 8,5).

2. 0,2 М L-аспарагин в 0,0125 М Na-фосфатный буфере, pH 8,5.

3. 20%-ная трихлоруксусная кислота.

4. Реактив Несслера.

5. Стандартные концентрации аммиака. Растворить 107 мг хлорида аммония в объеме 100 мл.

Калибровочную кривую строят для концентраций NH_3 от 0,1 до 2,0 мкмоль.

Фирма Sigma в своем информационном бюллетене рекомендует следующий набор реактивов:

А. 50 мМ трис-буфер, pH 8,6 при 37 °С. Готовится 100 мл раствора в деионизованной воде; pH доводится при 37 °С раствором 1М HCl.

Б. 189 мМ раствор L-аспарагина. Готовится в 10 мл деионизованной воды.

В. 6 мМ стандартный раствор сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Г. 1,5 М раствор трихлоруксусной кислоты. Готовится в 10 мл деионизованной воды из 6,1 N раствора ТХУ.

Д. Реактив Несслера.

Е. Раствор аспарагиназы, содержащий 2,0–4,0 МЕ/мл после разведения исходного препарата в деионизованной воде.

Процедура:

Готовят следующие реакционные смеси:

	Опыт	Контроль*	Контроль**
0,0125 М Na-фосфатный буфер	до 1 мл	0,8 мл	до 1 мл
0,02 М L-аспарагин	0,2 мл	0,2 мл	—
L-аспарагиназа, полученный раствор разводят холодной деиониз водой до 2,0–4,0 МЕ/мл перед опытом	0,1–0,5 мл	—	0,1–0,5 мл

Образцы инкубируют при 37 °С в течение 5–30 мин, в зависимости от активности фермента. Реакцию останавливают добавлением 0,5 мл ледяной 20%-ной ТХУ, оставляют на 5 мин. при 0 °С, затем пробу встряхивают на Вортексе и центрифугируют в течение 5 мин при 10000 об/мин на центрифуге Эппендорф. В стеклянные пробирки отбирают 0,25 мл супернатанта, доводят деионизованной водой до объема 2,25 мл, после чего добавляют 0,25 мл реактива Несслера и инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре.

Измеряют значение A_{500} опытных проб при длине волны 500 нм по отношению к соответствующим контролям. Контроль* – на неэнзиматический гидролиз L-аспарагина. Контроль** – на присутствие эндогенного аммиака во фракции фермента.

Расчет активности проводят по следующей формуле:

$$\text{Активность (мкмоль NH}_4\text{/мин)} = \frac{\text{разбавление фермента до 1 мл} \times 15 \times A_{500}}{\text{время инкубации}},$$

где 15 – разбавление аликвоты 0,25 мл из инкубационной смеси (1,5 мл после добавления раствора 20%-ной ТХУ) до конечного объема (2,5 мл) в реакции несслеризации.

Определение активности L-аспарагиназы

Активность аспарагиназ выражается в международных единицах (МЕ). За 1 МЕ активности фермента принимается его количество, катализирующее высвобождение из L-аспарагина 1 мкмоль аммиака за 1 мин в оптимальных условиях инкубационной среды.

Количество образовавшегося в ходе ферментной реакции NH_3 определяют по калибровочной кривой. Из-за относительной нестабильности реактива Несслера (даже при постоянном хранении в холодильнике) калибровочную кривую ежемесячно уточняют.

Удельная активность фермента рассчитывается на 1 мг белка. Количество белка в растворе аспарагиназы определяют либо по методу Лоури, либо спектрофотометрически. Измерение проводят на спектрофотометре при длине волны 280 нм, принимая за коэффициент экстинкции $\epsilon_{280}^{0,1\%} = 0,6$.

Примечание:

Построение стандартной калибровочной кривой:

Используя 2 мМ раствор NH_4Cl в пробирках, готовят растворы хлорида аммония в диапазоне концентраций 0,1–1,1 мкМ (объем этих растворов не может быть больше 2,25 мл), затем добавляют 0,25 мл реактива

Несслера и измеряют A_{500} проб при длине волны 500 нм по отношению к контролю – деионизованной воде.

Кривую строят, размещая по оси абсцисс количество аммиака, мкМ/ мл, по оси ординат – величины A_{500} .

Контрольные вопросы

1. *Дайте характеристику ферменту аспарагиназа.*
2. *Каков механизм противоопухолевой активности аспарагиназы?*
3. *Опишите МТТ-тест и его диагностическое значение.*
4. *Как определяют активность аспарагиназы?*

Литература

1. Тимаков, А.М. Препараты L-аспарагиназы в лечении острого лимфобластного лейкоза у детей / А.М. Тимаков [и др.] // Клиническая фармакология и фармакотерапия. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 90–93.
2. Попа, А.В. Возможности адекватного выбора различных препаратов аспарагиназы / А.В. Попа // Онкогематология. – 2007. – Т. 1. – С. 52–56.
3. Narta, U.K. Critical Reviews in Oncology / U.K. Narta, Sh.S. Kanwar, W. Azmi // Hematology. – 2007. – Vol. 61. – P. 208–221.
4. Sanches, M. Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases / M. Sanches, S. Krauchenco, I. Polikarpov // Current Chemical Biology. – 2007. – № 1. – P. 75–86.
5. Masetti, R. First-line treatment of acute lymphoblastic leukemia with pegasparaginase / R. Masetti, A. Pession // Biologics. – 2009. – № 3. – P. 359–368.

ГЛАВА 14. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Иммобилизация клеток микроорганизмов в производственном процессе впервые была применена более 150 лет назад. Бурное развитие методов иммобилизации клеток началось с 70-х гг. XX века, что было связано как с потребностями фундаментальных исследований в области биохимии, молекулярной биологии, физиологии, так и с разработкой современных биотехнологических производств. В 1966 г. появилось первое сообщение об иммобилизации клеток лишайника *Umbilicaria pustulata* в полиакриламидном геле.

Иммобилизация – это способ фиксации биокатализаторов (ферменты, клетки, протопласты и др.) в некоторой фазе, чаще всего нерастворимой, отделенной от другой фазы (раствора), при котором молекулы субстрата и продукта могут легко обмениваться между фазами. Для иммобилизации могут быть использованы адсорбенты органической (хитин, альгинат) или неорганической (глины, кремнеземы) природы, искусственные неорганические носители (углеродные материалы, керамика) и синтетические полимеры (полиэтилен, нейлон, полиуретаны).

Основные требования, предъявляемые к материалам, которые могут быть применены в качестве носителя для иммобилизации:

- высокая механическая, химическая и биологическая устойчивость, обеспечивающая стабильность получаемых иммобилизованных препаратов;
- возможность получения технологически удобных форм (гранул, мембран, листов и т.д.);
- обеспечение надежного удержания клеток, не затрагивая активности ферментативных систем;
- отсутствие нежелательного воздействия носителя на препарат (токсичность, температура, стресс и т.д.), а также препятствий для обеспечения иммобилизованного препарата субстратами, осуществления газообмена и отвода продуктов жизнедеятельности;
- высокая гидрофильность, определяющая возможность протекания реакций в водной среде;
- дешевизна носителя и простота процедуры иммобилизации, т.е. экономическая оправданность.

Клетки растений – уникальный и богатейший источник самых разнообразных биологически активных веществ. В условиях *in vitro* растительные клетки могут сохранять способность интактного растения к синтезу широкого спектра вторичных метаболитов и даже образовывать вещества, не обнаруживаемые в исходном растении. Культура клеток и тканей основана на получении каллусов, которые представляют собой основной объект при длительном культивировании *in vitro*. Однако биотехнологическое получение экономически важных фармакологически активных веществ в настоящее время основано на суспензионной культуре. Это связано с тем, что она характеризуется более высокой скоростью роста, более широкими возможностями для изучения влияния экзогенных факторов на метаболизм и рост клеток, а также простотой процедуры субкультивирования. Все это позволяет осуществлять технологический процесс на основе использования биореакторов [1]. Поэтому естественно, что именно клетки суспензионных культур являются наиболее перспективными объектами.

Тем не менее, ряд факторов (зачастую низкий выход целевого продукта, слабая механическая устойчивость, способность к агрегации, генетическая нестабильность и т.д.) затрудняет крупномасштабное использование растительных клеток в биотехнологических производствах.

С помощью методов иммобилизации могут быть решены многие из указанных проблем, связанные с получением сложных органических соединений. Применение для этих целей в промышленных масштабах иммобилизованных клеток растений является гораздо более эффективным по следующим причинам:

- возможность многократного использования биомассы;
- отсутствие затрат на выделение и очистку продуктов реакции;
- более высокая активность и способность к сверхсинтезу продуктов вторичного метаболизма;
- стабильность;
- наличие защиты от микробного заражения и механического повреждения;
- возможность длительного культивирования и создания непрерывных автоматических процессов.

Перечисленные преимущества определяют значительный технологический потенциал иммобилизованных растительных клеток.

Получение иммобилизованных систем клеток растений включает следующие этапы:

- выявление культуры клеток с определенными заданными свойствами, например, линии клеток с высоким выходом продукта и низкой скоростью роста;

- подбор соответствующего метода иммобилизации и условий культивирования, при которых жизнеспособность клеток и биосинтез целевого продукта поддерживались бы максимально длительное время;
- создание условий экскреции продукта из клеток в среду культивирования при сохранении жизнеспособности культуры.

К настоящему времени в ряде случаев иммобилизация оказалась эффективным приемом повышения синтеза вторичных веществ в растительных клетках. Некоторые примеры использования различных способов иммобилизации клеточных культур растений для стимуляции их биосинтетического потенциала приведены в табл. 14.1.

Таблица 14.1 – Использование иммобилизованных клеток суспензионных культур для стимуляции биосинтеза вторичных метаболитов

Метод иммобилизации	Иммобилизованные культуры	Использование
Гранулы, 2–5% охлажденная агароза (40–20 °C)	<i>Catharanthus roseus</i>	Синтез аймалицина <i>de novo</i>
Гранулы, 2–4% альгинат натрия, ионное поперечное связывание	<i>Catharanthus roseus</i>	Синтез алкалоидов <i>de novo</i>
	<i>Daucus carota</i>	Биотрансформация стероидов
	<i>Morinda citrifolia</i>	Синтез антрахинонов <i>de novo</i>
	<i>Digitalis lanata</i>	Биотрансформация дигитоксина
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Синтез никотина
	<i>Papaver somniferum</i>	Биотрансформация морфиновых алкалоидов
Листы, 5% бисакриламид + ксантановая смола, окислительно-восстановительная полимеризация	<i>Catharanthus roseus</i>	Синтез серпентина
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Синтез алкалоидов
Выращивание клеток внутри нейлонового сита	<i>Beta vulgaris</i>	Синтез бетацианина
Выращивание клеток внутри пенополиуретанового матрикса	<i>Capsicum frutescens</i>	Синтез капсаицина
Полые волокна	<i>Daucus carota</i>	Синтез фенольных соединений
В частицах, оксид полифенилена, поперечные сшивки	<i>Solanum aviculare</i>	Синтез гликоалкалоидов

В то же время нужно отметить, что практика применения иммобилизованных клеток основана главным образом на эмпирическом подходе. Условия иммобилизации и инкубации, материал носителя, процессы пермеабиллизации, способствующие экскреции конечного продукта, а также другие процедуры подбираются опытным путем. Это зачастую не позволяет добиться оптимальных условий технологического процесса и рационально использовать потенциал иммобилизованной клетки.

В этой связи возникает настоятельная потребность всестороннего изучения влияния процедуры иммобилизации на ход физиолого-биохимических процессов, протекающих в растительной клетке.

Процесс иммобилизации может оказывать значительное влияние на образование продуктов вторичного метаболизма посредством модификации внутриклеточных физиологических процессов. При изучении физиологии иммобилизованных растительных клеток были отмечены их особенности в ростовых процессах, фотосинтезе, поступлении элементов минерального питания и дыхании и т.д. по сравнению со свободными.

Самым эффективным методом иммобилизации растительных клеток является их включение в кальций-альгинатный гель. Альгинат – натуральный полисахарид, состоящий из D-маннуроновой и L-гулууроновой кислот.

Кривые роста свободных и иммобилизованных в кальций-альгинатном геле клеток имеют стандартную S-образную форму, тем не менее, отличающиеся на отдельных стадиях роста. Как пример, рассмотрим кривые роста клеток *Syringa vulgaris* (рис. 14.1).

В варианте со свободными клетками культуры *Syringa vulgaris* длительность лаг-фазы составляла трое суток, далее клетки вступали в фазу экспоненциального роста и на 10–12-е сутки культивирования – в стационарную фазу, продолжающуюся в среднем 3-е суток. Роста иммобилизованных клеток в первые трое суток также не наблюдалось (лаг-фаза), затем, на 4-е сутки, клетки вступали в фазу экспоненциального роста, а на 7–8-е сутки – в стационарную фазу. Иммобилизованные клетки достигали стационарной фазы роста на трое суток раньше, чем свободные. Увеличение продолжительности стационарной фазы происходило за счет уменьшения продолжительности экспоненциальной. Удлинение стационарной фазы приводило к увеличению содержания метаболитов, поскольку в этот период клетки не делятся [2]. Хотя общая сухая биомасса иммобилизованных клеток на стационарной фазе была ниже, чем свободных, для них не наблюдалось стадии деградации (рис. 14.1).

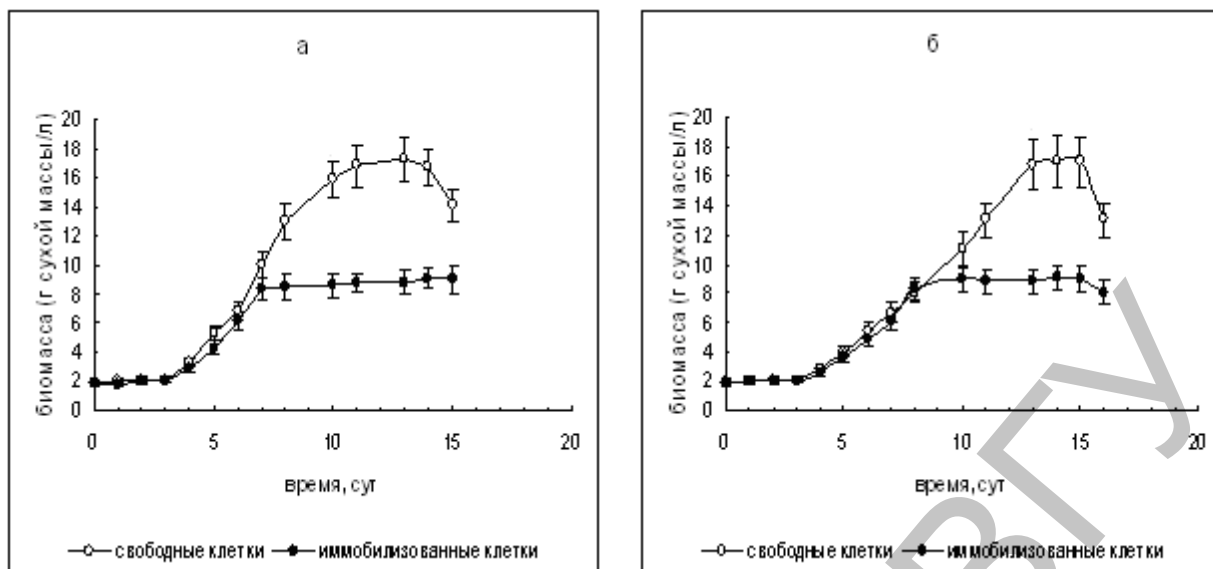


Рис. 14.1. Кинетика изменения сухой массы иммобилизованных и свободных клеток гетеротрофной (а) и фотомиксотрофной (б) суспензионной культуры сирени. Представлены средние значения 3-х экспериментов $\pm$ ошибка средней величины.

Сравнение фаз роста иммобилизованных и свободных клеток *Syringa vulgaris* позволяет сделать несколько основополагающих выводов. Кривые, описывающие лаг-фазу в обоих случаях, когда идет подготовка клеток к росту, практически совпадают. Далее, кривые в лог-фазе роста культуры клеток имеют одинаковый наклон, что говорит об одинаковом генетическом фонде, определяющем ростовой потенциал клеток независимо от иммобилизации. Характерная для свободных клеток фаза замедления роста отсутствовала для иммобилизованных клеток *Syringa vulgaris* как гетеротрофной, так и фотомиксотрофной суспензионной культуры сирени, т.е. в условиях иммобилизации практически сразу после логарифмической наступала стационарная фаза. Известно, что выход кривой на плато (стационарная фаза) происходит вследствие истощения ресурсов среды, при этом число клеток, их биомасса меняются мало, а митотический индекс падает. В работе [3] показано, что характер падения митотического индекса свободных суспендированных и включенных в агарозный гель клеток *C. roseus* аналогичен. Таким образом, перечисленные выше факты позволяют объяснить быстрый переход иммобилизованных клеток с логарифмической фазы роста на стационарный уровень. Истощение ресурсов среды приводит и к торможению ростовых процессов, и более низкой наработке биомассы иммобилизованными клетками, которая в конечном итоге компенсируется более длительной по времени стационарной фазой. Более того, удлинение стационарной фазы приводит к увеличению содержания

конечного продукта, поскольку клетки находятся в неделящемся состоянии, т.е. в период наименее вероятного возникновения генетических изменений, более продолжительное время.

Метаболическая активность растительных клеток в значительной мере зависит от функционирования фотосинтетического аппарата, которое определяется уровнями накопления таких пигментов, как хлорофиллы и каротиноиды. Для выяснения влияния иммобилизации на содержание фотосинтетических пигментов использовалась фотомиксотрофная суспензионная культура клеток *Syringa vulgaris* (табл. 14.2.)

Таблица 14.2 – Содержание пигментов (мкг/г сухой массы) в клетках фотомиксотрофной суспензионной культуры *Syringa vulgaris*

Пигменты	Фазы роста		
	Ляг (3 сут)	Лог (7 сут)	Стационарная (14 сут)
Свободные клетки			
Хлорофилл <i>a</i>	78±4	31±3	81±5
Хлорофилл <i>b</i>	47±3	27±2	52±4
Соотношение <i>a/b</i>	1,7±0,2	1,2±0,1	1,6±0,2
Каротиноиды	42±4	28±2	45±4
Иммобилизованные клетки			
Хлорофилл <i>a</i>	78±4	42±3	22±2
Хлорофилл <i>b</i>	47±3	30±3	28±4
Соотношение <i>a/b</i>	1,7±0,2	1,4±0,1	0,8±0,1
Каротиноиды	42±4	43±4	39±3

Следует отметить резкое снижение содержания хлорофилла *a*, а также почти двукратное уменьшение хлорофилла *b* на стационарной фазе в иммобилизованных клетках по сравнению со свободными. Количество каротиноидов на этой стадии практически не изменилось. Небольшие различия в содержании хлорофилла *b* при увеличении содержания хлорофилла *a* и каротиноидов отмечаются на логарифмической фазе роста. Содержание пигментов на стационарной фазе в свободных клетках увеличивается, тогда как в иммобилизованных падает.

Поскольку иммобилизованные клетки находятся в гетерогенной двухфазной системе, существенное влияние на внутриклеточные биохимические процессы оказывает разделение субстратов, газов, питательных элементов и др. Ведущую роль в этих процессах играет плазматическая мембрана. Проницаемость мембраны может изменяться под действием носителя, что приведет к изменению поступления элементов в клетку.

В связи с этим на примере иммобилизованных клеток суспензионной культуры *Syringa vulgaris* были изучены закономерности сдвигов pH, нетто-потоков ионов K^+ , NO_3^- , NH_4^+ . Регистрацию кинетики изменения содержания протонов, калия, нитрат и иона аммония в среде культивирования проводили с помощью ионселективных электродов.

В процессах транспорта минеральных элементов в клетку растений особую роль играет H^+ -АТФазная помпа, определяющая перенос других ионов через плазматическую мембрану [4]. Для иммобилизованных клеток по сравнению со свободными наблюдается более значительный выход протонов в среду на протяжении периода их роста (14 суток). Поступление ионов калия в клетки мало отличается в обоих вариантах. Для свободных и иммобилизованных клеток сирени кривые, описывающие транспорт протонов и калия на всех фазах роста, практически параллельны. Это свидетельствует о близкой скорости их поступления и отсутствии влияния альгината кальция на процессы переноса этих ионов в клетках культуры *Syringa vulgaris*.

Характер поступления ионов аммония и нитрат-иона в иммобилизованные клетки отличается от их поступления в свободные. Исходя из качественных и количественных изменений зависимостей, описывающих поступление аммония и нитратов, можно говорить о различных механизмах их переноса через плазматическую мембрану иммобилизованных и суспендированных клеток *Syringa vulgaris* [5].

Очевидно, что процессы фотосинтеза, поступления минеральных веществ и другие, обуславливающие рост и развитие растений, определяют и интенсивность биохимических реакций, направленных на синтез вторичных метаболитов. В случае иммобилизованных клеток это выражается в более высокой активности и стабильности вторичных метаболических процессов по сравнению со свободными клетками культуры.

При длительном культивировании свободные растительные клетки часто претерпевают значительные изменения. Поэтому важным биотехнологическим параметром является стабильность клеточной культуры как в отношении процессов роста, так и в отношении синтеза биологически активных веществ. Как было отмечено выше, у иммобилизованных клеток наблюдается удлинение стационарной фазы роста. Таким образом, синтез необходимого продукта происходит, когда клетки характеризуются ограниченной скоростью делений. За счет более длительной стационарной фазы можно решить и ряд проблем, связанных с излишней наработкой биомассы.

С помощью меченых предшественников было показано, что вследствие замедления ростовых процессов продукты первичного метаболизма накапливаются и/или становятся более доступными для процессов вторичного метаболизма. Поэтому системы иммобилизованных культур характеризуются стабильностью продуктивного биокатализа в течение длительных промежутков времени. Например, иммобилизованные клетки *Capsicum frutescens* в оптимальных условиях могут оставаться в продуктивной фазе на протяжении 90–180 часов, *Digitalis lanata* – 170 ч, *Catharanthus roseus* – 200 ч [6].

Иммобилизованные клетки могут быть использованы для биотрансформации и биокатализа. В частности, процесс биотрансформации экзогенного сердечного гликозида β -метилдигитоксина до β -дигоксина клетками *Digitalis lanata*, иммобилизованными в кальций-альгинатном геле, происходит за счет реакции гидроксирования, катализируемой ферментом, содержащимся в клетках, и характеризуется увеличением скорости по сравнению с культурой неиммобилизованных клеток [7]. В ряде других работ была также установлена стимуляция активности ферментов при заключении клеток в иммобилизующие матриксы.

Наряду с реакциями биоконверсии (12- β -гидроксирование, восстановление двойной связи) культивируемые растительные клетки могут осуществлять синтез органических соединений *de novo*. При этом если известен путь биосинтеза, то выход целевого продукта можно увеличить добавлением предшественников в питательную среду. Так, например, при иммобилизации культуры клеток *Catharanthus roseus* было установлено увеличение скорости синтеза *de novo* серпентина и аймалицина – предшественников ценных в фармакологическом отношении индольных алкалоидов винбластина и винкристина [8]. Активация синтеза вторичных метаболитов *de novo* наблюдалась также при иммобилизации в альгинате кальция *Morinda citrifolia* (антрахиноны) [9], *Nicotiana tabacum* (никотин, скополин) [10], *Datura innoxia* (тропановые алкалоиды скополамин и атропин) [11].

Рассмотрим полученные нами результаты по действию альгината кальция на биохимическую активность культуры суспендированных клеток, полученных из каллусов некоторых лекарственных растений.

Так, были установлены различия в активности триптофан декарбоксилазы (ТДК) и содержании триптамина в свободных и иммобилизованных клетках суспензионной культуры *Catharanthus roseus* (рис. 14.2).

На 14-е сутки инкубации активность ТДК в иммобилизованных клетках возрастает до 0,23 мкг триптамина/мкг белка/мин (примерно на 40%)

по сравнению со свободными. Содержание триптамина в иммобилизованных клетках снижается на 75% по сравнению со свободными.

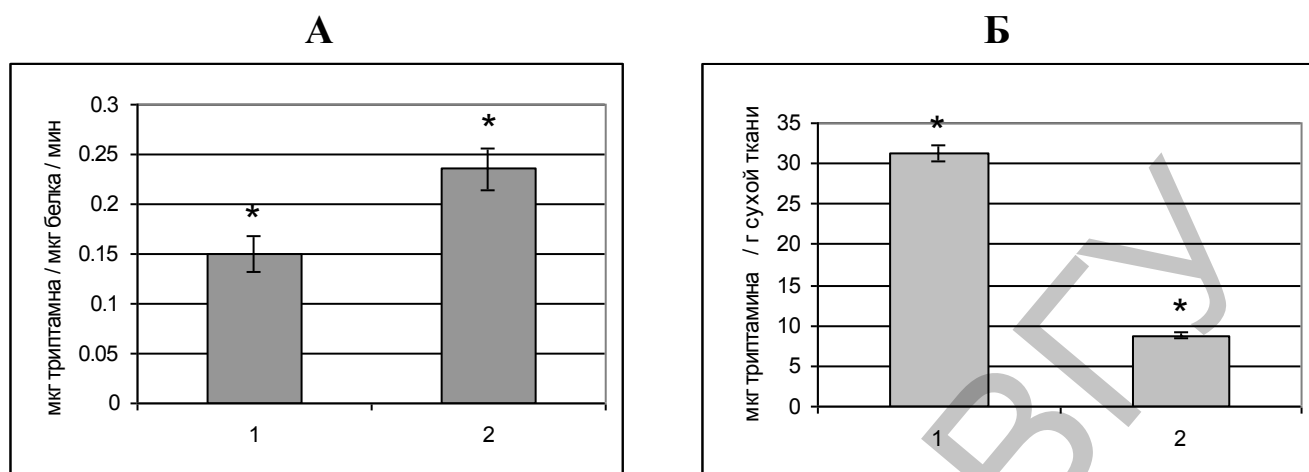


Рис. 14.2. Активность ТДК (А) и содержание триптамина (Б) в свободных (1) и иммобилизованных (2) клетках суспензионной культуры *Catharanthus roseus*.

Примечание: * различия между вариантами достоверны при $p \leq 0,05$.

Уменьшение накопления триптамина в иммобилизованных клетках наряду с повышенной активностью фермента, катализирующего его биосинтез, может быть обусловлено, во-первых, экскрецией триптамина в среду инкубации. Такая способность к повышенной спонтанной экскреции внутриклеточных метаболитов в принципе характерна для большинства препаратов иммобилизованных клеток. Во-вторых, триптамин, являясь предшественником индольных алкалоидов, может под влиянием иммобилизации активно вовлекаться в последующие этапы биосинтетических процессов, не накапливаясь в клеточных структурах.

Полученные в наших исследованиях результаты по содержанию фенольных соединений в клеточных культурах *Syringa vulgaris* показали, что на 3-и сутки культивирования – в лаг-фазу – в свободных и иммобилизованных клетках не наблюдалось достоверных отличий. При увеличении продолжительности культивирования количество фенольных соединений в свободных клетках постепенно увеличивалось и достигало максимума к стационарной фазе – 10–14 сутки – и составляло 15,2–16,4 мг/г сухой массы (рис. 14.3).

В иммобилизованных клетках содержание исследуемых соединений также увеличивалось и достигало максимальных значений раньше – на 8-е сутки культивирования, что также соответствовало стационарной фазе роста этих клеток, и составляло 20,8 мг/г сухой массы. К 10-м и 14-м суткам культивирования достоверного изменения в содержании фенольных соединений в иммобилизованных клетках по сравнению с 8-ми сутками не происхо-

дило. Таким образом, проведенные исследования показали, что иммобилизация индуцировала увеличение содержания фенольных соединений в клетках.

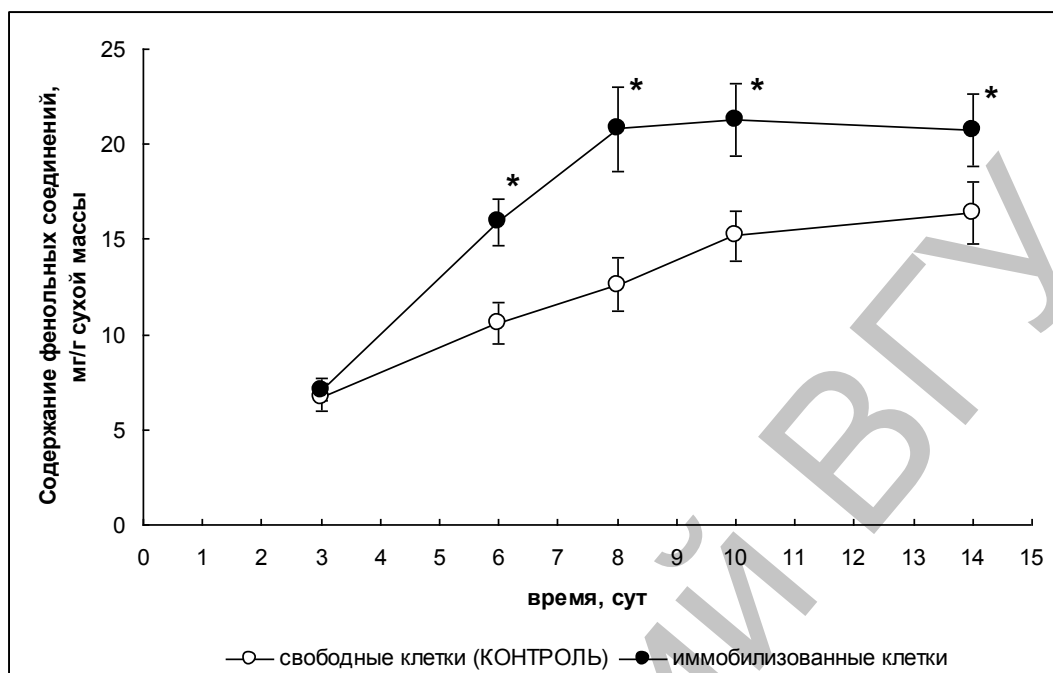


Рис. 14.3. Содержание фенольных соединений в свободных и иммобилизованных клетках суспензионной культуры *Syringa vulgaris* в зависимости от времени культивирования.

Примечание: * различия достоверны по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

Изучение влияния иммобилизации на содержание гидроксикоричных кислот в клетках суспензионной культуры *Echinacea purpurea* показало, что на начальных этапах ростового цикла (лаг-фаза) и в ходе лог-фазы более высокие уровни накопления анализируемых вторичных метаболитов отмечались для свободных клеток суспензионной культуры, а на стационарной фазе – в иммобилизованных (рис. 14.4).

Содержание гидроксикоричных кислот в иммобилизованных клетках на 5-е и 9-е сутки (лаг- и лог-фаза, соответственно) практически не отличалось между собой и соответствовало таковому в свободных клетках перед проведением процедуры иммобилизации. Отсутствие изменений в содержании гидроксикоричных кислот у иммобилизованных клеток на протяжении 9 суток культивирования, вероятно, связано с их адаптацией к функционированию в условиях окружения носителем. При переходе к стационарной фазе отмечалось резкое возрастание уровня гидроксикоричных кислот в иммобилизованных клетках – в 1,4 раза по сравнению со свободными клетками. Таким образом, иммобилизация приводила к стимуляции накопления гидроксикоричных кислот в клетках эхинацеи пурпурной к концу ростового цикла.

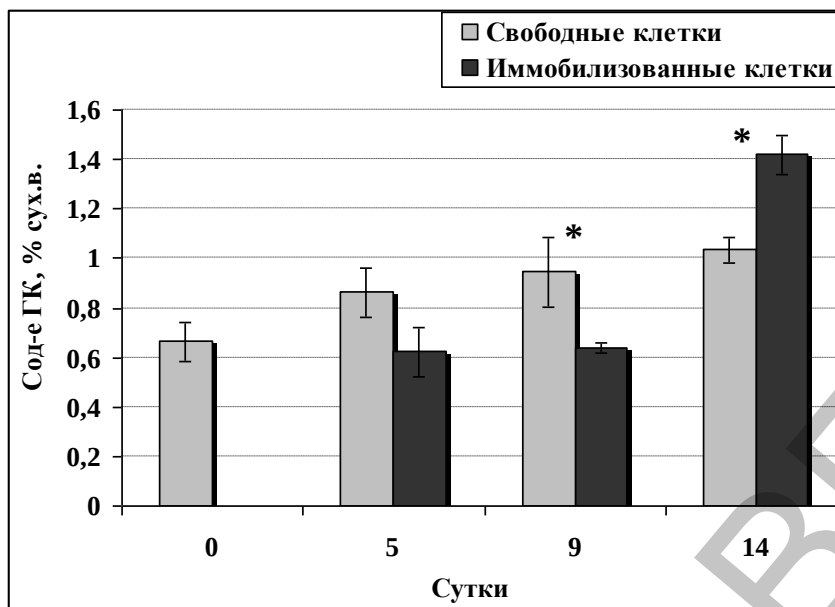


Рис. 14.4. Динамика изменения содержания гидроксикоричных кислот в свободных и иммобилизованных клетках суспензионной культуры *Echinacea purpurea* в ходе ростового цикла.

Примечание: * различия между вариантами достоверны при $p \leq 0,05$.

Количество экскретируемых гидроксикоричных кислот на всех стадиях ростового цикла было выше у иммобилизованных в кальций-альгинатном геле клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea*. При этом следует отметить, что если в лаг-фазу отмечалось выделение в питательную среду 17% от суммарного содержания гидроксикоричных кислот в иммобилизованных клетках и среде культивирования, то при переходе к лог-фазе и стационарной фазе – 10 и 5% соответственно. Данный эффект, вероятно, обусловлен резким увеличением содержания суммы гидроксикоричных кислот в клетках *Echinacea purpurea* в результате их иммобилизации при переходе к стационарной фазе ростового цикла. Таким образом, в стационарную фазу ростового цикла активно происходит наработка продукта, а для его выхода из клеток требуется создание дополнительных условий.

Регуляция синтеза вторичных метаболитов при иммобилизации обусловлена многими факторами. Возникновение стрессовых для растительной клетки условий, к которым приводит создание микросреды внутри матрикса, может повысить синтез или экскрецию продукта. Использование стрессовых факторов, в том числе элиситоров, – одна из наиболее эффективных стратегий увеличения синтеза необходимых вторичных метаболитов в клетках культуры растений.

Стрессовая реакция растительной клетки, инициируемая процессом иммобилизации, сопровождается генерацией активных форм кислорода и приводит к росту метаболической активности. В частности, при иммобили-

зации клеток культуры и протопластов *Catharanthus roseus* в агарозном геле наблюдали стимуляцию синтеза индольных алкалоидов, сопровождающуюся ростом активности пероксидазы и α -галактозидазы [12].

Полисахариды, используемые в качестве иммобилизующего матрикса, могут действовать как элиситоры. Так, например, пектин и хитозан вызывают рост концентрации антрахинонов в клетках суспензионной культуры *Morinda citrifolia* [13]. Воздействие хитозана и альгината натрия как элиситоров на клетки суспензионной культуры *Plumbago rosea* приводит, соответственно, к восьми- и двукратному увеличению накопления нафтохинона плюмбагина – соединения, обладающего противоопухолевой активностью [14]. Активность альгината как карбогидратного элиситора, стимулирующего вторичный метаболизм – продукцию капсаицина, была обнаружена при исследовании иммобилизованных клеток суспензионной культуры *Capsicum frutescens* [15].

С другой стороны, исследование влияния хитозана на клетки суспензионной культуры *Glycine max* показало, что хитозан изменяет проницаемость плазматической мембраны для Ca^{2+} и происходит быстрый выброс иона из предварительно нагруженных $^{45}\text{Ca}^{2+}$ клеток [16]. В данном случае, по-видимому, хитозан действует как элиситор, влияющий на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} .

При иммобилизации также происходит стимуляция экскреции продуктов вторичного метаболизма в культуральную среду. Например, свободные клетки суспензионной культуры *Juniperus chinensis* аккумулялировали подофиллотоксин во внутриклеточных компартментах, тогда как иммобилизованные с использованием кальций-альгината клетки экскретировали его в культуральную среду в значительных количествах (до 4 мг/г сухой массы) [17]. В другом случае иммобилизовали в кальций-альгинатные гранулы клетки суспензионной культуры *Nicotiana tabacum*, продуцирующие скополин. Свободные клетки суспензионной культуры аккумулялировали скополин в цитоплазматических компартментах, иммобилизованные, напротив, экскретировали значительные его количества [10].

Механизмы стимуляции процесса биосинтеза вторичных метаболитов в клетках культуры при иммобилизации могут быть различными в зависимости от вида растения. Так, например, при иммобилизации суспензионных культур *Crusilata glabra* и *Vitis vinifera* в гранулах с использованием пектина и хитозана в качестве носителей наблюдался рост внутриклеточной концентрации перекиси водорода, который мог быть обусловлен либо прямым элиситорным действием полисахаридов, либо стрессом, инициируемым возникновением микросреды [18]. В иммобилизованных клетках

культуры *Crusilata glabra* также в 5 раз увеличивалась концентрация антрахинона и в 34 раза – его экскреция в среду инкубации по сравнению со свободными клетками культуры. В то же время при иммобилизации клеток культуры *Vitis vinifera* генерация перекиси водорода (в 4,4 раза ниже, чем в иммобилизованной *Crusilata glabra*) не сопровождалась ростом концентрации антрахинона. Было установлено, что в клетках *Crusilata glabra* перекись водорода является вторичным медиатором, который опосредует продукцию антрахинона при стрессе, инициируемом возникновением микросреды в процессе иммобилизации. В то время как на клетки суспензионной культуры *Vitis vinifera* носители оказывают непосредственное влияние в качестве элиситоров [18].

Таким образом, инициируемая иммобилизацией стрессовая реакция клетки приводит к активации сигнальных каскадов, в ряде случаев стимулируя синтез вторичных метаболитов. Модуляция метаболической активности клеток при иммобилизации вследствие возникновения микросреды, как стрессового фактора, и/или элиситорного действия носителя, зависит от вида культуры и пути синтеза конкретного вторичного метаболита. Следовательно, *идентификация путей передачи сигнала и компонентов сигнальной трансдукции позволит регулировать и повышать эффективность продукционного процесса различных видов вторичных метаболитов, ферментов и рекомбинантных белков в культурах растительных клеток.*

В ряде работ предполагается, что немаловажную роль играет заряд носителя, формирующего экстраклеточный матрикс при иммобилизации. Было показано, что в процессе иммобилизации клеток *Coffea arabica* именно заряд кальций-альгината влияет на секрецию полисахаридов, модификацию структуры формирующейся клеточной стенки, что сопровождается активацией синтеза алкалоидов [19].

Содержание пектина в образующихся клеточных стенках было значительно выше при иммобилизации протопластов *Linum usitatissimum* в носителе, имеющем заряженные группы (кальций-альгинатном), чем при иммобилизации в нейтральном агарозном геле [20].

Исследования экспрессии генов, ассоциированных со специфическими морфогенетическими ответами протопластов *Linum usitatissimum*, показали, что синтез *de novo* специфических полипептидов не различается при иммобилизации в агарозе и альгинате кальция, в то время как количество этих специфических полипептидов в ионно-связанном с клеточной стенкой состоянии значительно выше при иммобилизации в альгинате кальция. Таким образом, наблюдается прямая корреляция между морфогенетическими

ответами, образованием ионных связей между белками и клеточной стенкой и электростатическими свойствами иммобилизующего матрикса [21].

Участие Ca^{2+} как вторичного медиатора в трансдукции внешних сигналов и его важное полифункциональное значение для процессов роста и развития растительной клетки хорошо изучены [22]. Однако его роль при иммобилизации исследована явно не достаточно. Существуют лишь единичные работы. Так, при сравнительном анализе влияния Ca^{2+} , альгината и кальций-альгината на синтез сесквитерпенов в клетках культуры *Hyosyatus muticus* при иммобилизации было обнаружено, что ключевая роль принадлежит именно кальцию [23]. В ряде работ предполагается, что кальций-альгинатный матрикс является депо Ca^{2+} . Вероятный механизм, по которому Ca^{2+} как вторичный медиатор оказывает влияние на физиологическое состояние клеток растений при иммобилизации, может включать его высвобождение из полисахаридного матрикса и активацию Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны.

Весьма удобным объектом для иммобилизации являются одноклеточные водоросли, например, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Digitalis* и др. Что касается высших растений, то для иммобилизации могут быть использованы не только клетки, но и протопласты, полученные ферментативным разрушением клеточных стенок. Наиболее широко в последнее время, как уже отмечалось, для иммобилизации используются клетки суспензионных культур, которые получают обычно из каллусной ткани рыхлого типа. Такая ткань легко фрагментируется на отдельные клетки и небольшие агрегаты при помещении ее в перемешиваемую жидкую среду.

Каллусная культура. Технология получения каллусной культуры сводится к следующему. На первом этапе производится выбор эксплантов. Наиболее пригодный материал для получения каллусов дает проращивание простерилизованных семян в асептических условиях. Поэтому в наших экспериментах источником эксплантов при введении в культуру *in vitro* лекарственных растений служили асептически выращенные 3–4-недельные их проростки. Для стандартизации полученных результатов по всем исследуемым нами культурам приводятся материалы, относящиеся к каллусу листового происхождения.

Для культивирования растительных объектов *in vitro* наиболее часто используется питательная среда Мурасиге и Скуга [24], которая дает хорошие результаты при каллусообразовании и эффективно поддерживает рост клеточных культур большинства двудольных растений. Для индукции дедифференциации и каллусогенеза абсолютно необходимо присутствие в питательной среде двух групп фитогормонов – ауксинов и цитокининов.

В качестве ауксинов для получения и поддержания культур тканей использовались β -индолил-3-уксусная кислота (ИУК), α -нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). В качестве источников цитокининов в питательных средах использовали кинетин и 6-бензиламинопурин (БАП). Оптимальные их сочетания для каждой конкретной культуры подбирались опытным путем.

Для получения суспензионных культур использовали длительно пасируемые каллусные ткани, которые имели рыхлую консистенцию. Первичный каллус для этих целей использовать хуже, так как обычно он содержит более плотные агрегаты клеток.

Суспензионная культура. Получение суспензионной культуры также возможно непосредственно из эксплантов, помещенных в жидкую среду. Возникающие на поверхности экспланта каллусные клетки могут отрываться и переходить в среду, давая начало суспензии. Но это длительный и малоэффективный процесс. Для некоторых исследований суспензионную культуру клеток получают путем ферментативной мацерации растительных тканей, например, из мезофилла листа, но такую суспензию невозможно поддерживать в течение длительного времени.

Для получения первичной суспензии, как правило, используют 2–3 г свежей массы каллусной ткани на 60–100 мл жидкой питательной среды. Для избавления от крупных плотных остатков каллуса, больших клеточных агрегатов ее фильтруют через 1–2 слоя марли, нейлона или отбирают одиночные клетки и мелкие агрегаты путем осаждения крупных агрегатов при отстаивании суспензии в течение нескольких минут. Колбы помещают на качалку, скорость вращения которой обычно составляет 110–120 об/мин.

Клеточные суспензии обычно требуют регулярного и более частого субкультивирования, чем каллусные культуры. Часть суспензионной культуры, используемая для пересадки на свежую среду, называется инокулом. Для каждой линии культуры клеток существует минимальный размер инокулома, при уменьшении объема которого культура не растет.

Суспензия никогда не бывает однородной, состоящей только из одиночных клеток. В лучшем случае последние составляют 50–60%, остальное приходится на долю групп из 2–10 клеток и многоклеточные агрегаты. В зависимости от степени агрегированности выделяют слабоагрегированные (до 5–10 клеток), среднеагрегированные (более 10 клеток) и высокоагрегированные суспензии (более 50 клеток в агрегате).

В попытке получить суспензионные культуры, проявляющие высокий уровень клеточной диссоциации, чаще всего прибегают к контролю состава питательной среды. Ауксины, как правило, оказывают поло-

жительное влияние на процессы диссоциации клеток, а цитокинины, напротив, тормозят их. Следовательно, условия, благоприятствующие растяжению клеток и тормозящие их деление, способствуют максимальной диссоциации клеток в суспензии.

Природа углеводов в питательной среде, оказывающих влияние на межклеточные контакты через изменение поверхностных полисахаридов, также может играть определенную роль. Так, введение в питательную среду сахарозы, галактозы и раффинозы способствовало формированию клеточных агрегатов. Выращивание клеток с добавлением целлюлолитических ферментов (мацерозим, пектиназа, целлюлаза) в сочетании с осмотиком увеличивало дисперсность суспензии.

Хорошей считается суспензия, состоящая из морфологически выровненных клеток, имеющих небольшие размеры и агрегированных в мелкие группы, включающие не более 10 клеток. Оптимальная плотность клеток в суспензии, обеспечивающая хороший рост, составляет 10^5 – 10^6 в 1 мл среды.

Иммобилизация клеток. Для иммобилизации растительных клеток применяют различные способы:

- на поверхности носителя. В этом случае поверхность или часть поверхности носителя «омывается» внешней средой (жидкой или газообразной);

- в носителе или в массе (объеме) носителя. Между внешней средой и препаратом в результате иммобилизации появляется слой материала носителя. В данном случае свойства носителя (например, пористость, заряд, гидрофильность) в значительной степени могут сказываться на функционировании иммобилизованного препарата и на уровне реализации потенциальных возможностей;

- с использованием мембранной технологии. Препарат и небольшая часть внешней среды помещены в замкнутый объем, отделенный от остальной среды избирательно проницаемой мембраной, размер пор, в которой таковы, что субстраты и продукты через них проникают, а иммобилизованный препарат удерживается внутри замкнутого объема.

Наибольшее распространение в настоящее время получили способы иммобилизации растительных клеток путем их встраивания в гранулы полисахаридных гелей природного происхождения. В качестве носителей используют желатин, пектин, хитозан, агарозу, альгинат кальция, каррагинан калия и др.

В наших исследованиях иммобилизацию клеток проводили в асептических условиях. К суспензии клеток добавляли 3% раствор альгината натрия в соотношении 1:1, перемешивали и переносили в инъектор, с помощью которого получали альгинатные гранулы в 250 мМ CaCl_2 . По истече-

нии 20 минут стабилизации гранулы трижды промывали дистиллированной водой и помещали для инкубации в среду Мурасиге и Скуга, содержащую фитогормоны в необходимых концентрациях. Иммобилизованные клетки инкубировали в термостате при температуре 25 °С на качалках ротационного типа (скорость перемешивания 100–120 об/мин).

Деиммобилизация клеток. Для определения физиологических и биохимических параметров иммобилизованных клеток необходимо освободить клетки от носителя. С этой целью кальций-альгинатные гранулы с клетками помещали в раствор 0,1 моль/л цитрата натрия и непрерывно перемешивали барботированием воздухом до полного растворения геля. Клетки отделяли от раствора цитрата натрия фильтрованием через бумажный фильтр.

В ряде случаев удаление носителя проводили при выдерживании клеток в течение 1 ч в среде $\frac{1}{2}$ MS с добавлением калий фосфатного буфера при pH 7,5.

Экстракция веществ. Для определения качественного и количественного содержания биологически активных веществ в клеточных культурах приготавливаются экстракты. Вначале материал высушивается. Для выделения различных классов вторичных метаболитов экстракцию сухого сырья проводят ацетонитрилом, гексаном, хлороформом, водой, метиловым спиртом, 70% и 94% этиловым спиртом согласно Государственной Фармакопеи [25]. В случае иммобилизованных клеток экстракции предшествовала процедура снятия носителя.

Выделение фенольных соединений, а также флавоноидов из растительного материала проводили последовательным экстрагированием 94% и 70% этанолом при 25 °С. Полноту извлечения определяли по реакции с NaHCO_3 . Экстракция гидроксикоричных кислот осуществлялась с помощью 40%-го этанола при нагревании с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 45 мин.

Идентификация физиологически активных соединений проводилась несколькими способами.

Спектрофотометрический и флуорометрический анализ. Для спектрофотометрического анализа экстракты разбавлялись в 20 раз соответствующими растворителями. Спектры поглощения экстрактов анализировали с помощью спектрофотометра Varian Cary 50.

Сумму растворимых фенольных соединений определяли спектрофотометрически с помощью реактива Фолина–Дениса (смесь фосфомолибденовой и вольфрамовой кислот) по Суэйну и Хиллису [26] с некоторыми

модификациями. Максимум поглощения окрашенных растворов соответствует длине волны 720–750 нм.

Для спектрофотометрического анализа в пробирку вносили: 0,5 мл полученного экстракта или 1 мл среды (в которой культивировались клетки), 7 мл дистиллированной воды; 0,5 мл реактива Фолина-Дениса; 1 мл насыщенного раствора Na_2CO_3 ; 1 мл (в случае экстракта) или 0,5 мл (при определении в среде) дистиллированной H_2O и встряхивали. Полученную смесь оставляли на 1 ч до проявления окраски и использовали для определения оптической плотности при $\lambda=725$ нм. Контрольный раствор содержал все компоненты смеси, только вместо исследуемого экстракта или среды добавляли такое же количество спирта или воды соответственно.

Расчет содержания фенольных соединений в клетках в пересчете на хлорогеновую кислоту производили по формуле:

$$C_{\phi} = a \cdot V \cdot p / m,$$

где C_{ϕ} – содержание фенольных соединений, мг/г сухой массы клеток;

a – содержание хлорогеновой кислоты, определяемое по калибровочному графику, мг/мл;

V – объем спиртовой вытяжки из клеточной биомассы, мл;

p – степень разведения;

m – масса навески, г.

Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот производили согласно [27]. Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр, измеряли его объем (раствор А), а затем в опытную пробирку вносили 1 мл экстракта и 9 мл дистиллированной воды (раствор В). Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 330 нм. Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту и сухое сырье в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = (D \cdot V_A \cdot V_B) / (m \cdot 782),$$

где D – оптическая плотность экстракта при 330 нм;

V_A – объем раствора А, мл;

V_B – объем раствора В, мл;

782 – удельный показатель поглощения цикориевой кислоты при 330 нм;

m – масса сырья, г.

Активность триптофан декарбоксилазы определяли методом, описанным Sangwan et. al., 1998 [28]. Суспензионную культуру центрифуги-

гировали при 200 g, отбирали супернатант, а осажденные клетки использовали для анализа. Осадок гомогенизировали в среде 1, содержащей 100 мМ фосфатного буфера (pH 7,5), 5 мМ β -меркаптоэтанол, 5 мМ тиомочевину, 100 мг/г поливинилпирролидон. Гомогенат центрифугировали при 10 000g в течение 30 мин, супернатант использовали для определения активности фермента. Иммобилизованные клетки отфильтровывали и гомогенизировали в среде 1, гомогенат центрифугировали при 200 g, супернатант использовали для определения активности фермента. Все процедуры проводили при 4 °C. Концентрацию белка определяли методом Бредфорд. Среда для определения активности фермента содержала 100 мМ фосфатного буфера, 3,5 мМ β -меркаптоэтанола, 1 мМ L-триптофана и 1 мМ пиридоксаль-5'-фосфата (pH 8,5). Реакцию запускали внесением супернатанта, содержащего 100 мкг белка. Реакцию останавливали добавлением 2,0 мл 4 М NaOH. Триптамин экстрагировали 3,5 мл этилацетата. Содержание триптамина в экстракте измеряли с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse при длине волны испускания 280 нм и эмиссии – 350 нм. Содержание триптамина определяли по соответствующей калибровочной кривой.

Определение содержания триптамина. Для определения содержания триптамина использовался метод Sangwan с соавт. [28]. Клетки центрифугировали при 200 g. Осадок гомогенизировали в среде, содержащей 100 мМ фосфатного буфера (pH 7,5), 2 мМ ЭДТА, 4 мМ меркаптоэтанол и 5% (вес/объем) поливинилпирролидон. Затем 100 мкл грубого экстракта вносили в среду, содержащую 100 мМ фосфатного буфера (pH 7,5) и 2 мМ ЭДТА объемом 1 мл, добавляли 2 мл 4 М NaOH и экстрагировали этилацетатом. Все манипуляции проводили при 4 °C. Триптамин детектировали как описано выше.

Таким образом, в наших исследованиях были получены каллусные и суспензионные культуры ряда лекарственных растений, содержащих разнообразные группы вторичных метаболитов, были оптимизированы условия иммобилизации клеток в кальций-альгинатный гель, а также деиммобилизации, проведен качественный и количественный анализ содержания отдельных физиологически активных соединений, получаемых из клеточных культур исследуемых растительных объектов.

Перспективы использования иммобилизованных растительных клеток весьма широки, и их вкратце можно свести к следующим:

- создание моноферментных биокатализаторов, обеспечивающих полный синтез целевого продукта, включая лекарственные препараты;
- разработка биокатализаторов нового поколения на основе одновременной иммобилизации продуцентов и ферментов трансформации продукта биосинтеза;

- решение проблем экологической безопасности (биосенсоры, биочипы) и охраны окружающей среды (переработка и утилизация промышленных отходов и стоков и т.д.);
- интенсификация сельскохозяйственного производства и новые методы культивирования растений.

Контрольные вопросы

1. Опишите иммобилизацию как способ фиксации биокатализаторов (ферментов, клеток, протопластов и др.).
2. Назовите преимущества применения в промышленных масштабах иммобилизованных клеток растений.
3. Почему эффективным методом иммобилизации растительных клеток является их включение в кальций-альгинатный гель?
4. Какая культура клеток используется для изучения влияния иммобилизации на содержание фотосинтетических пигментов?
5. Почему системы иммобилизованных культур характеризуются стабильностью продуктивного биокатализа в течение длительных промежутков времени?
6. Как влияют стрессовые факторы, в том числе элиситоры, на синтез необходимых вторичных метаболитов в клетках культуры растений?
7. Какова технология получения каллусной культуры?
8. Как получают суспензионные культуры?
9. Каковы технологии иммобилизации и деиммобилизации растительных клеток?
10. Какие биохимические методы используют для идентификации физиологически активных соединений?
11. Каковы перспективы использования иммобилизованных растительных клеток?

Литература

1. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Физиология растений: учебник для студентов вузов / Н.Д. Алехина [и др.]; под общ. ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
3. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / С.П. Бидей [и др.]; под общ. ред. Дж. Вудворда. – М.: Мир, 1988. – 215 с.
4. Юрин, В.М. Минеральное питание растений: учеб. пособие для студентов / В.М. Юрин, С.Н. Найдун. – Минск: БГУ, 2004. – 236 с.

5. Шапчиц, М.П. Ионнообменные процессы в суспендированных и иммобилизованных клетках *Syringa vulgaris* / М.П. Шапчиц, В.М. Юрин // Вестник БГУ. Сер. 2. – 2010. – № 2 (в печати).
6. Knorr, D. Immobilization and permeabilization of cultured plant cells / D. Knorr, S.M. Miazga, R.A. Teutonico // Food Technol. – 1985. – Vol. 39, № 10. – P. 135–140.
7. Park, Y.S. Biotransformation by immobilized *Digitalis lanata* cell cultures / Y.S. Park, H.K. Kim, H.J. Hong, D.I. Kim // Journal of Korean Ind. and Eng. Chemistry. – 1995. – Vol. 6, № 2. – P. 222–229.
8. Ziyad-Mohammed, M.T. Plant cell immobilization in alginate and polyurethane foam / M.T. Ziyad-Mohammed, A.H. Scragg // Method in molecular biology. – 1990. – Vol. 6. – P. 513–536.
9. Brodelius, P. Stress induced secondary metabolism in plant cell culture / P. Brodelius // In Pais MSS, Mavituna F., Novais JM (eds) Plant cell biotechnology. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1988. – 195 p.
10. Gillet, F. Immobilization of *Nicotiana tabacum* plant cell suspensions within calcium alginate gel beads for production of enhanced amounts of scopolin / F. Gillet // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – Vol. 26. – P. 229–234.
11. Gontier, E. Effects of calcium, alginate, and calcium-alginate on growth and tropane alkaloid levels of a stable of *Datura innoxia* Mill. / E. Gontier, B.S. Sangwan, J.N. Barbotin // Plant Cell Reports. – 1994. – Vol. 13. – P. 533–536.
12. Nobuaki, M. Production of cell wall accumulative enzymes using immobilized protoplasts of *Catharanthus roseus* in agarose gel / M. Nobuaki [et. al.] // Biotechnology Letters. – 2003. – Vol. 25. – P. 1687–1693.
13. Dörnenburg, H. Effectiveness of plant-derived and microbial polysaccharides as elicitors for anthraquinone synthesis in *Morinda citrifolia* cultures / H. Dörnenburg, D. Knorr // J. Agric. Food Chem. – 1994. – Vol. 42. – P. 1048–1052.
14. Komaraiah, P. Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and in situ adsorption / P. Komaraiah [et. al.] // Journal of Biotechnology. – 2003. – Vol. 101. – P. 181–187.
15. Lindsey, K. The synthetic potential of immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill. Cv. Annum / K. Lindsey, M.M. Yeoman // Planta. – 1984. – Vol. 162, № 6. – P. 495–501.
16. Young, D.H. Release of calcium from suspension-cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations, and polyamines in relation to effect on

- membrane permeability / D.H. Young, H. Kauss // *Plant Physiology*. – 1983. – Vol. 73. – P. 698–702.
17. Prmjet, D. Production of Podophyllotoxin by Immobilized Cell Cultures of *Juniperus chinensis* / D. Prmjet, S. Tashibana // *Pakistan Journal of Biological Sciences*. – 2004. – Vol. 7, № 7. – P. 1130–1134.
 18. Dörnenburg, H. Evaluation of immobilization effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes / H. Dörnenburg // *Process Biochemistry*. – 2004. – Vol. 39. – P. 1369–1375.
 19. Haldimann, D. Redirecting cellular metabolism by immobilization of cultured plant cells: a model study with *Coffea arabica* / D. Haldimann, P. Brodelius // *Phytochemistry*. – 1987. – Vol. 26. – P. 1431–1434.
 20. David, H. Pectins in walls of protoplast-derived cells embedded in agarose versus alginate beads / H. David. [et. al.] // *Protoplasma*. – 1995. – Vol. 86. – P. 122–130.
 21. Roger, D. Immobilization of flax protoplasts in agarose and alginate beads / D. Roger, A. David, H. David // *Plant Physiology*. – 1996. – Vol. 112. – P. 1191–1199.
 22. White, P.J. Calcium in plants / P.J. White, M.R. Broadley // *Ann. Bot.* – 2003. – Vol. 92. – P. 487–511.
 23. Curtis, W.R. Role of calcium and differentiation in enhanced sesquiterpene elicitation from calcium alginate-immobilized plant tissue / W.R. Curtis, P. Wang, A. Humphrey // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1995. – Vol. 17, № 6. – P. 554–557.
 24. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1968. – Vol. 15, № 13. – P. 473–497.
 25. Государственная Фармакопея СССР. 10-е издание / под ред. М.Д. Машковского. – М.: Медицина, 1968. – 1086 с.
 26. Swain, T. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents / T. Swain, W.E. Hillis // *Journal of Science Food Agricultural*. – 1959. – Vol. 10. – P. 63–68.
 27. Куркин, В.А. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea* / В.А. Куркин, О.И. Авдеева, Е.В. Авдеева, П.Г. Мизина // *Растительные ресурсы*. – 1998. – Т. 34, вып. 2. – С. 81–85.
 28. Sangwan, R.S. Direct fluorometry of phase-extracted tryptamine-based fast quantitative assay of L-tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* leaf / R.S. Sangwan, S. Mishra, S. Kumar // *Anal. Biochem.* – 1998. – Vol. 255. – P. 39–46.

ГЛАВА 15. ОСТЕОИНДУКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПЕРЛАМУТРА И ЕГО КОМПОНЕНТОВ

Список сокращений

ЭПЖ – экстрапаллиальная жидкость моллюска; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; GFP – зеленый флуорисцентный белок; ЩФ – щелочная фосфатаза.

1. Остеоиндуктивные свойства перламутра и его компонентов

Структура и рост перламутра. Перламутр рассматривается в качестве одного из наиболее перспективных и исследуемых материалов в реконструктивной медицине и ортопедии. Для понимания процессов образования костной ткани *de novo* и репарации костных дефектов с помощью перламутра рассмотрим вопрос строения и роста перламутрового слоя раковин моллюсков. Раковины двустворчатых моллюсков состоят из трех слоев: внешнего органического, среднего призматического и внутреннего пластинчатого – собственно перламутрового. Моллюски строят раковину с помощью мантии, насыщенной множеством пор, через которые выделяются частицы известкового вещества. Оно откладывается слой за слоем, формируя раковину.

Углекислый кальций существует в 3-х различных полиморфах: *аргоните*, *кальците* и *ватерите*. Два первых чаще всего встречаются как биологические полиморфы. Арагонит наиболее распространен в морских организмах.

Пластинчатый, или перламутровый, слой покрывает внутреннюю поверхность раковины и состоит из плоских кристаллов арагонита (полиморф карбоната кальция), ориентированных параллельно внутренней поверхности раковины. Кристаллы имеют гексагональный, квадратный или ромбический облик, примерно равную толщину (0,3–0,5 мкм) и величину от 3 до 30 мкм. Они одинаково удалены друг от друга и склеены органической матрицей (матриксом) толщиной до микрона и менее. Фактически, минеральная фаза перламутрового слоя раковин моллюсков на 90–95% состоит из арагонита.

Как известно, у человека 60–70% массы костей приходится на минеральные соли, причем, примерно половина солей представлена гранулами фосфата кальция, находящегося в аморфном состоянии. Другая половина – кристаллы гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Оставшиеся 10–20% массы

кости – органические компоненты клеток и межклеточного вещества. Содержание воды в костях очень низкое: от 6 до 20%.

Рассмотрим процесс построения раковины моллюска. Здесь самое активное участие принимает экстрапаллиальная жидкость, выделяемая мантией животного, заполняющая одноименную, узкую полость между раковиной и мантией. Содержание химических элементов в ней аналогично крови моллюска, но в экстрапаллиальной жидкости находятся такие ферменты, как щелочная фосфатаза и карбоангидраза. Симкис и Вада рассматривают их в качестве критических агентов различных схем кальцинирования.

Важную роль в образовании раковины играет органическая, или белковая, матрица (матрикс), которая синтезируется эпителием мантии. В ее состав входят простые и специализированные белки, сложные аминокислоты (21 аминокислота), мукополисахариды. Очевидно, количество органического вещества в раковине находится в прямой зависимости от возраста моллюсков. Органическая матрица представляет собой тот субстрат, на котором происходит кристаллизация полиморфа карбоната кальция (арагонита) с образованием минеральной части раковины. Органическая матрица представляет собой мягкие мембраны, обнаруживающие под электронным микроскопом «кружевное» строение.

Также у человека, органическая часть матрикса кости (внеклеточного вещества) играет важную роль в минерализации и последующем минеральном обмене. В состав матрикса входят:

1. Коллаген (в основном I типа, в меньшем количестве представлен коллаген V типа) – составляет 95% массы органического матрикса кости. На коллагеновых волокнах (в промежутках между молекулами тропоколлагена) сорбирована значительная часть минеральных гранул и кристаллов.

2. Неколлагеновые макромолекулярные соединения: фосфопротеины, протеогликаны, гликопротеины; морфогенетические белки кости, такие, как остеонектин и остеокальцин, а также ферменты – щелочная фосфатаза (в остеобластах) и кислая фосфатаза (в остеокластах). Оба эти фермента служат маркерами соответствующих клеток костной ткани. Углеводная часть протеогликанов костного матрикса представлена дерматан- и кератансульфатами. Эти соединения главным образом способствуют минерализации кости, а именно:

- а) концентрированию кальция в кости (фосфопротеины);
- б) образованию минеральных соединений (щелочная фосфатаза);
- в) связыванию этих соединений с коллагеном (протеогликаны);
- с) дальнейшему росту минеральных кристаллов и агрегатов (остеонектин).

Рассмотрим, что же является источником солей кальция при построении раковины и перламутрового слоя для моллюсков?

Результаты исследований показывают, что кальций в мантии моллюсков находится в двух состояниях – ионном и связанном. Связанный кальций вместе с органическим веществом обнаруживается в клетках мантийного эпителия в виде мельчайших гранул, заметных только при электронномикроскопических исследованиях. Это неактивный кальций. Активный (ионный) кальций находится в полостной жидкости и участвует в процессе кальцинирования раковины. Предполагается, что неактивный кальций переходит в активную форму с помощью одного из ферментов цикла трикарбоновых кислот – карбоангидразы, находящейся на поверхности кальциевых гранул. Другими словами, степень активности кальция зависит от того, где этот элемент находится в теле моллюска. В тканях моллюска кальций не активен, в соединении с органическим веществом он является только потенциальным источником для использования его моллюском. Переход кальция из ткани в экстрапаллиальную жидкость одновременно переводит его неактивную форму в активную. Такой кальций в любой момент готов вступить в реакцию с углекислотой.

Анион CO_3^{2-} накапливается в организме метаболическим путем. Благодаря ферменту ангидразы он поступает в цикл кальцинирования и при взаимодействии с активным кальцием в присутствии органических веществ выпадает в виде минеральной фазы. Эта фаза в зависимости от состава и строения матрицы принимает форму кальцита или арагонита.

2. Представление о процессах биоминерализации

Главный объект исследования биологической минерализации – минерально-органический агрегат (кости и зубы человека и животных, раковины моллюсков, скелет кораллов, отолиты и другие объекты), который имеет кристаллическое строение и при рентгеновских исследованиях дает дифракцию рентгеновских лучей.

Главная особенность биоминерализации состоит в том, что органическая матрица сильно влияет на характер биогенного минералообразования. Она определяет центры зарождения будущих кристаллов и способствует их росту. Другая особенность матрицы – ее сравнительно постоянный состав в разных организмах, включающий белки коллагеновой группы, высокомолекулярные полисахариды, фосфолипиды.

Матрица обладает сродством к возникающему на ее основе минеральному компоненту. В случае кальцит-арагонитовой минерализации участки матрицы находятся в сфере валентного взаимодействия с катионами

кальция и плоскими анионами CO_3^{2-} , образуя особые комплексы. Наряду с валентными взаимодействиями, большую роль при образовании таких комплексов играют и более слабые связи – водородные, Ван-дер-Ваальса и др. Образование центров начальной кристаллизации происходит в строго упорядоченных точках матрицы – там, где энергетически выгоден процесс зарождения кристаллической фазы.

Перламутровый слой, как и другие минеральные образования, представляет собой агрегат кристаллов. В отличие от обычных минеральных агрегатов биогенные кристаллы (и слагающие их кристаллиты) не только не срастаются, но даже не соприкасаются между собой. Каждый кристаллический индивид обволакивается, как чехлом, органической пленкой химического состава, аналогичного матрице. Толщина пленки зависит от величины кристалла. Она проницаема для минералообразующих физиологических растворов, питается ими и не подвергается процессу минерализации. Такое явление, названное Голубевым принципом обволакивающих пленок, наблюдается в большинстве биогенных кристаллов

3. Комплекс протеинов как основа кристаллизации арагонита в перламутровом слое

Кальцинированный слой раковины состоит из двух кристаллических полиморфов CaCO_3 : арагонита (внутренний перламутровый слой) и кальцита (внешний призматический слой). Минеральные слои раковины содержат около 5% органической матрицы, выделяемой мантией. Органическая матрица состоит из ЭДТА-растворимой (этилендиаминтетрауксусная кислота) и нерастворимой фракций. Основными составляющими этих фракций являются белки, полисахариды и липиды. Считается, что эти фракции регулируют формирование сложной структуры раковины.

Белки, богатые аспарагиновой кислотой являются основными компонентами ЭДТА-растворимой органической матрицы. Считается, что ЭДТА-растворимые белки играют важную роль в кристаллическом образовании ядра, росте и задержке роста кристаллов, кристаллическом полиморфизме и ориентировании атомной решетки.

ЭДТА-нерастворимая матрица перламутрового слоя имеет сравнительно высокое содержание неполярных аминокислот. Основными компонентами являются фибриллярные белки, богатые глицином и аланином. Полагают, что именно фибриллярные белки обеспечивают остов органической матрицы, вокруг которого откладывается углекислый кальций.

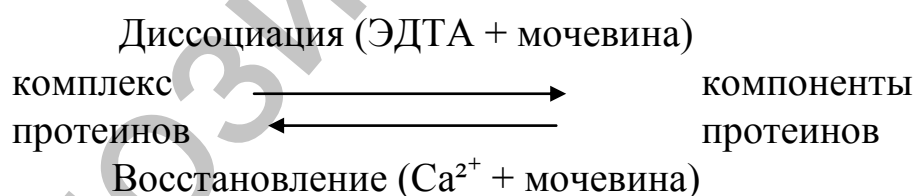
Перлин – протеин ЭДТА-нерастворимой матрицы, содержит сульфатные группы, связанные с мукополисахаридами. Этот протеин имеет мо-

лекулярный вес около 15 kDa. Удалось клонировать кДНК перлина и построить его полную аминокислотную последовательность, состоящую из 129 аминокислот. Нозерн-блотинг показал, что тРНК перлина является специфичной для эпителия мантии.

Формирование кристаллов в основе перламутра состоит из двух основных этапов – ядрообразования и роста. Ранее высказывали предположения, что участок ядрообразования имеет способность связывать кальций и содержит серу и кислый мукополисахарид. Это предположение подтвердилось с открытием перлина, который является сульфатированным гликопротеином. Считается, что кальций взаимодействует с отрицательно заряженными сульфатными группами, связанными с мукополисахаридом этого белка.

Перлин выполняет три возможных функции: (1) вместе с шелк-фиброин-подобным белком участвует в образовании каркаса органической матрицы, вокруг которого откладывается углекислый кальций, (2) выполняет роль якоря между растворимым, кислым белком и нерастворимым шелк-фиброин-подобным белком и (3) действует в качестве шаблона для ядрообразования.

Не только перлин, но и весь комплекс белков органической матрицы является неотъемлемой, функциональной частью, или молекулярным механизмом для кристаллизации арагонита. Для того чтобы подтвердить необходимость присутствия белковых компонентов в процессе кристаллизации арагонита, были проведены опыты по диссоциации и восстановлению комплекса протеинов. В результате была доказана следующая взаимосвязь:



Очищенный перлин и другие компоненты комплекса, сами по себе или их концентрированные смеси, не вызывают кристаллизацию арагонита. Однако комплексы в состоянии до диссоциации и восстановленные комплексы способны вызывать кристаллизацию арагонита с нормальной эффективностью. Интенсивность флуоресценции перлина падает с добавлением Ca^{2+} , что указывает на конформационные изменения при связывании с Ca^{2+} .

Исследования Aizo Matsushiro, Tomoyuki Miyashita (2003) показали, что выделенный протеиновый комплекс из перламутрового слоя жемчуга в основном состоит из перлина (15 kDa) и жемчужного кератина (20 kDa). Добавка к этому комплексу незначительного количества насыщенного рас-

твора углекислого кальция, содержащего Mg^{2+} , вызывало кристаллизацию арагонита. Таким образом, этот комплекс является неотделимой функциональной частью матрикса, необходимой для кристаллизации арагонита.

4. Карбоангидраза перламутрового слоя двустворчатых моллюсков

Кристаллизация, наблюдаемая у многих организмов, является генетически регулируемым процессом. Hiroshi Miyamoto, Tomayuki Miyiyashita (1996) полагают, что полиморфизм, наблюдаемый в кристаллах углекислого кальция, таких, как арагонит и кальцит, в раковине моллюска определяется протеинами органической матрицы, выделяемой эпителием мантии. Однако, тонкая детальная структура этих протеинов известна не до конца и для понимания молекулярных механизмов процесса минерализации необходимо проведение детальнейших исследований в отношении протеинов органической матрицы.

Из перламутрового слоя моллюска *Pinctada fucata* был выделен протеин 60 kDa, составляющий значительную часть органической матрицы перламутрового слоя, который назвали накреином. В мантии моллюска были обнаружены крайне высокие уровни мРНК накреина. Анализ кДНК накреина показал, что он имеет домен, аналогичный карбоангидразе (КА).

Анализ последовательности аминокислот показал, что белок содержит два функциональных домена – повторный домен и домен карбоангидразы и Gly–Xaa–Asn (Xaa=Asp, Asn или Glu), который катализирует образование HCO_3^- и участвует в образовании кристаллов углекислого кальция перламутрового слоя.

У млекопитающих определено несколько факторов, регулирующих костный морфогенез. Остеопонтин – кислый, связывающий кальций протеин, выделен из минеральной фазы костей. Другой протеин костной матрицы – остеокальцин – содержит радикалы γ -карбоксиглутаминовой кислоты, которые участвуют в связывании кальция.

Полагают, что накреин, имеющий кислый домен, является кальций-связывающим протеином. Вероятно, в перламутровом слое накреин является основным кальций-связывающим протеином, богатым аспарагиновой кислотой (Лабораторная работа № 1). Falini и Belcher показали, что кислые макромолекулы, экстрагированные из призматического и перламутрового слоев раковины, вызывают *in vitro* образование кристаллов кальцита и арагонита соответственно. Эти результаты дают основание полагать, что макромолекулы модулируют стереохимическое расположение карбонатных групп в процессе кристаллизации биологического углекислого кальция.

Показано, что мантия моллюска обладает карбоангидразной активностью. Домен КА накреина в наибольшей степени идентичен человеческой КАII (28% идентичности) и человеческой KAI, III, IV, V и VI (23–27% идентичности). КАII кур, мышей, крыс и кроликов показывает 26–28% идентичности. Эти гомологии аминокислотной последовательности указывают на то, что накреин в большей степени подобен КАII, чем различным изоэзимам.

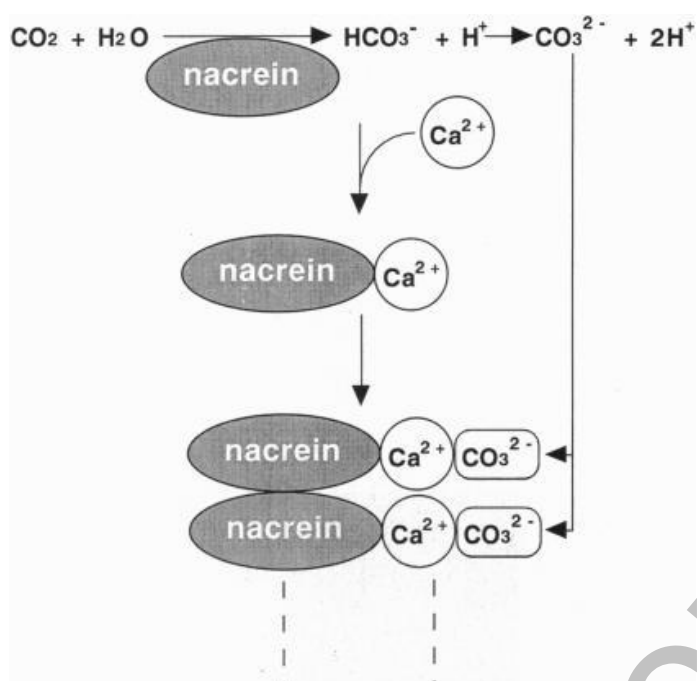


Рис. 15.1. Модель формирования накреином перламутрового слоя [Miyamoto et. al., 1996].

В 1996 г. Miyamoto, Miyashita была предложена модель образования перламутрового слоя накреином (рис. 15.1). CO_2 , возникающий в результате дыхания, посредством накреинов превращается в присутствии H_2O в HCO_3^- . После связывания ионов кальция накреин модулирует стереохимическое положение карбонатных групп, диссоциированных из HCO_3^- для образования кристаллов арагонита. Поскольку углекислый кальций растворяется при низких значениях pH, возможно, что протеины, продуцированные ферментативной реакцией,

разжижаются в морской воде или удаляются протонной помпой.

Дальнейший подробный анализ воздействия накреина на образование ядра и эпитаксиальный рост кристаллов арагонита может привести к более глубокому пониманию процессов во многих организмах [Miyamoto et. al., 1996].

5. Характеристика новых белков, входящих в состав минерально-органической системы раковин моллюсков

Люстрин А. Специфические белки и полисахариды внеклеточного матрикса раковин контролируют морфологию и упаковку кристаллов карбоната кальция и включаются в состав минерального конгломерата при формировании перламутрового слоя. Американские ученые Xueyu Shen, Angela M. Belcher (1997) клонировали и охарактеризовали кДНК, кодирующую люстрин А, – новый матричный белок из перламутрового слоя раковины морского брюхоногого *Halotis rufescens*. Было показано, что мРНК люстрина А специфически синтезируется в клетках мантии, ответственных за секрецию белков раковины. Молекулярная масса белка составил

65 kDa. С-терминальный домен белка имеет большую степень сходства с известными ингибиторами протеаз. Люстрин А является полифункциональным белком. Он в дополнение к его структурной роли в остове нерастворимого матрикса играет важную роль, взаимодействуя с полианионными детерминирующими арагонит белками, защищает белковые компоненты матрикса от деградации и отвечает за прочность перламутра [14].

Призмалин-14. Призмалин-14 – белок кислой, нерастворимой фракции призматического слоя, выделенный из раковины *Pinctada fucata*. Белок содержит 105 аминокислотных остатка, участки, подобные участкам кератина позвоночных, и N- и С-терминальные аспарагин-богатые регионы. Призмалин-14 обладает ингибиторной активностью на преципитацию карбоната кальция и кальций-связывающей активностью *in vitro*. Призмалин-14 играет роль каркасного белка, а также регулирует процесс кальцинирования призматического слоя раковины.

Мукоперлин. Из мантийной ткани моллюска *Pinna nobilis* была выделена мРНК белка мукоперлина. Полученный белок имел молекулярную массу 66,7 kDa. Показано, что мукоперлин локализован в перламутровом арагонитовом слое.

Известно, что свежая экстрагированная слизь моллюска, которая секретируется эпителием в воду, и некоторые компоненты органического матрикса ингибируют кристаллизацию карбоната кальция *in vitro*. Была предложена гипотеза «антикальцификации»: выделяющаяся слизь защищает нежное тело моллюска от спонтанной минеральной инкрустации в насыщенной морской воде.

Специфическое взаимодействие мукоперлина с пластинками перламутра, а не с призмами, указывает на то, что белок играет функциональную роль в процессе кальцинирования и является не случайным включением в состав раковины. Weiner и Traub предложили гипотетическую модель, описывающую формирование перламутра. Нерастворимые компоненты матрикса формируют гидрофобную «полость» остова, к которым прикрепляются растворимые, кислые, богатые Asp/Glu-X и Asp/Glu-Ser-X мотивами белки, принимая при этом β -конформацию. Эти повторяющиеся кислые составляющие индуцируют ядрообразование CaCO_3 и способствуют эпитаксиальному росту кристаллов или, в противоположность, ограничивают рост кристалла, когда покрывают ростовую поверхность.

Мукоперлин плотно окружает пластинки перламутра, это, вероятно, указывает на его первичную функцию ограничения кристаллического роста, подобно механизму, описанному Wheeler [Wheller et al., 1988]. Эта гипотеза согласуется с идеей оригинальной функции мукоперлина – антикальцинирования [13].

Перлюцин и перлюстрин. Перлюцин и перлюстрин – растворимые в воде белки, выделенные из перламутрового слоя *Haliotis laevis*. Перлюцин является функциональным С-типом лектина и обладает Ca^{2+} -зависимой карбогидратной активностью к галактозе и маннозе. Перлюцин включается в структуру растущих кристаллов карбоната кальция в присутствии хлорида натрия. Перлюстрин является гомологом N-терминального домена инсулин подобного фактора роста млекопитающих, связывающего белки.

6. Кальций-связывающий белок из экстрапаллиальной жидкости моллюсков

Кальций-связывающий белок из экстрапаллиальной жидкости, выделяемой мантией моллюска (ЭПЖ), представляет собой гликопротеин, который, вероятно, является предшественником или строительным блоком растворимого органического матрикса раковины. Этот кислый протеин представляет из себя димер (340 Da) и составляет 56% от тотального количества белков ЭПЖ. При добавлении кальция к очищенному белку последний связывает кальций, и данный процесс сопровождается значительными перестройками вторичной структуры в белке. Такие структурные перестройки запускают его ассоциацию в более крупные протомеры. Процесс обратим при удалении из системы кальция.

Не только перламутр моллюсков, но и костная ткань человека содержит регуляторные белки, способствующие ее образованию и росту.

Остеопонтин – кислый, связывающий кальций протеин минеральной фазы костей человека, был впервые выделен и идентифицирован в 1985 г. Это секреторный фосфорилированный сиалопротеин, про-пептид которого образуется 314 аминокислотными остатками (а. о.), из которых на долю лидирующей последовательности приходится 16 а. о. Белок О-гликозилирован и содержит ряд фосфорилированных остатков серина. Ген остеопонтина экспрессируется во многих клеточных линиях, где обнаруживает различные типы экспрессии. Конститутивная экспрессия остеопонтина найдена в клетках костной ткани, почек плаценты, нервных клетках, макрофагах, а индуцибельный тип экспрессии наблюдался в Т-лимфоцитах, клетках эпидермиса. Усиление экспрессии происходит под воздействием различных агентов: 1,25 дигидроксивитамина D₃, основного фактора роста фибробластов (bFGF), фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина-1 (IL-1), липополисахаридов, g-интерферона (g-IFN). Таким образом, регуляция экспрессии гена остеопонтина находится под комплексной системой контроля, которая может отличаться у клеток разных типов. Ввиду того, что белок имеет способность связываться с гидроксиа-

патитом, остеопонтин вовлечен в связывание остеокластов на минерализованной поверхности кости. Доказано связывание остеокластов с остеопонтином, нанесенным на поверхность из стекла и пластика.

Остеонектин (синонимы: BM-40, SPARC, от англ. *secreted protein acidic and rich in cysteine*) – гликопротеин кости, состоит из 4 доменов, к 2 из которых могут присоединяться ионы Ca^{2+} . Это кислый белок, богатый цистеином, имеет высокое сродство к коллагену I типа и к гидроксиапатиту, содержит Ca-связывающие домены. Поддерживает в присутствии коллагена концентрацию Ca и P. Предполагается, что белок участвует во взаимодействии клетки и матрикса.

Остеокальцин – небольшой белок, наиболее широко представлен в костном матриксе, содержит радикалы γ - карбоксиглутаминовой кислоты, которые участвуют в связывании кальция. Белок участвует в процессе кальцификации, служит маркером для оценки активности метаболизма костной ткани, составляя 15% экстрагируемых неколлагеновых белков. Состоит из 49 аминокислотных остатков, три из которых являются кальций-связывающими. Синтезируется и секретируется остеокальцин остеобластами. Его синтез на уровне транскрипции контролирует кальцитриол (1,25-дигидроксиголекальциферол), кроме того, в процессе «созревания» в остеобластах он подвергается витамин K-зависимому карбоксилированию трех остатков глутаминовой кислоты. Во внеклеточном матриксе карбоксилированные остатки карбоксиглутаминовой кислоты способны связывать ионизированный Ca^{2+} и, таким образом, остеокальцин прочно связывается с гидроксиапатитом. В связанном виде находятся 90% белка. 10% вновь синтезированного остеокальцина сразу диффундирует в кровь, где может быть обнаружен. Циркулирующий в периферической крови остеокальцин – маркер костного метаболизма, и его определение имеет диагностическое значение при остеопорозе, гиперпаратиреозе и остеодистрофии. При остеокластической резорбции остеокальцин костного матрикса высвобождается в кровь в виде полипептидных фрагментов. В результате в моче появляются метаболиты γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Таким образом, повышение общего остеокальцина в сыворотке отражает активизацию остеогенеза.

7. Модель кристаллического роста в перламутровом слое

В соответствии с центральным принципом биоминерализации, белки и другие органические полимеры играют важную роль в контроле ядрообразования и роста кристаллов. Специфическая роль отводится растворимым полианионным белкам как молекулам, связывающим кальций. Такие белки имеют β -слои с пространственным расположением боковых анион-

ных цепей, подобно расположению в пространстве ионов кальция в кристаллах карбоната кальция. «Зрелый» перламутр состоит из псевдогексагональных или полигональных арагонитовых таблеток диаметром 15 мкм и высотой 0,5 мкм (рис. 15.2). Зрелые таблетки формируют горизонтальный, плотный уровень, который сложен вместе в вертикальном направлении. Спереди они напоминают стопку монет, где следующий слой арагонитовых таблеток зарождается, когда подлежащий все еще не достиг необходимой плотности.

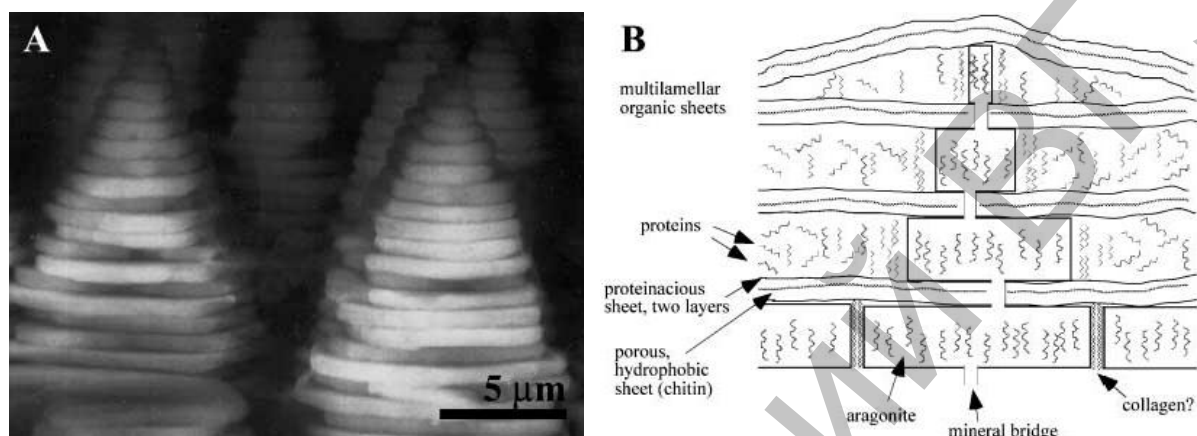


Рис. 15.2. Арагонитовые таблетки в составе перламутра [Fritz, Morse, 1998].

Каждый арагонитный слой разделен интерламеллярными слоями, и каждая таблетка окружена капсулой из того же органического матрикса (рис. 15.3), который также присутствует в составе арагонитовой таблетки, и именуется «внутрикристаллическим белком». Белковый матрикс размером несколько нм играет важную роль в формировании арагонита. Его белковые компоненты деградируют под действием протеиназы К, доказывая, что органический слой состоит из белков. Молекулы различных белков прикреплены к филаментной сети хитина, которая локализована в середине интерламеллярного слоя (рис. 15.2). Хитиновая сеть гидрофобна и вместе с белковым слоем образует «форму», в которую секретируются минеральные ионы. Интерламеллярные перегородки многослойны и состоят из нерастворимого в воде хитинового ядра, расположенного между двумя слоями нерастворимых в воде белков. Затем на их поверхность садятся растворимые белки.

Модель гетероэпитаксиального роста указывает на то, что образование и рост каждой арагонитовой таблетки определяется органическим слоем. Исследования показывают, что для роста и образования кристаллов арагонита необходим белковый слой интерламеллярной прослойки. Таким образом, новая модель предполагает непрерываемый рост кристаллов через

минеральные мостики. Недавние исследования демонстрируют, что ростом кристалла управляют кооперативные взаимодействия белков матрикса с белками раствора. Однако для понимания молекулярных деталей биоминерализации необходимо дальнейшее изучение составляющих матрикса.

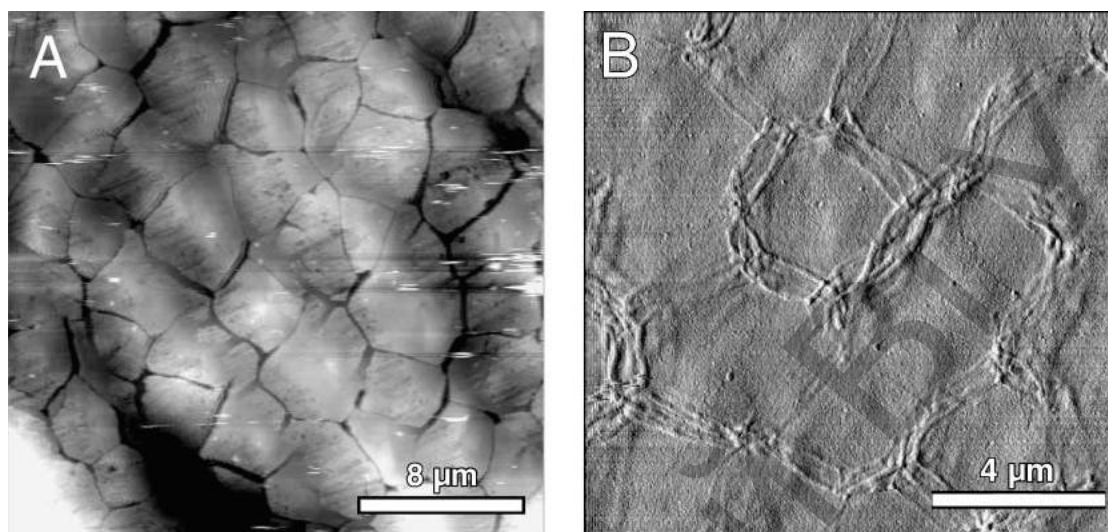


Рис. 15.3. Перламутр после действия 0,5 м ЭДТА. (А) Плотнo упакованные полигональные арагонитовые таблетки диаметром 5–10 мкм. (В) Органический матрикс, полученный после 1 часа инкубации перламутра в 10% уксусной кислоте. Белковые филаменты формируют сеть вокруг и между арагонитовыми таблетками [7].

8. Минерализация кости человека

В процессе минерализации кости человека, клетки костной ткани, остеобласты и остециты развиваются из мезенхимных клеток склеротома мезодермы, а остеокласты имеют иное – гематогенное происхождение. Кальций в костях находится в форме минерала гидроксиапатита, образует кристаллы, имеющие обычно размер $20 \times 5 \times 1,5$ нм. Минеральная часть костей включает также карбонаты, гидроксиды и цитраты. В процессе минерализации кости важную роль играют все основные компоненты костной ткани, в том числе костеобразующие клетки (osteoblastы*) и клетки, разрушающие костную ткань (osteoclastы**). Определяющий фактор минерализации – взаимное расположение молекул тропоколлагена со смещением на $1/4$ длины молекулы. Считается, что промежутки между молекулами тропоколлагена являются центрами минерализации кости, в которых начинается отложение фосфата кальция сначала в аморфном виде с последующим образованием кристаллов гидроксиапатита. Остеобласты контролируют минерализацию посредством регуляции транспорта ионов кальция и фосфата через свои мембраны. Присутствующая в них щелочная фосфатаза высвобождает неорганический фосфат из органических фосфорсодержа-

щих соединений. Освобождающаяся фосфорная кислота реагирует с солями кальция с образованием $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Гликопротеин остеонектин имеет высокое сродство к коллагену I типа и к гидроксипатиту. Он содержит Ca^{2+} -связывающие домены и способствует осаждению Ca^{2+} и PO_4^{3-} в присутствии коллагена. Определенную роль в процессе минерализации играют также кислые фосфопротеины, специфичные для костной ткани. Они содержат последовательности поли-Asp и поли-Glu, к которым присоединяется кальций, это может быть пусковым моментом в процессе минерализации. Костная ткань, несмотря на высокую степень минерализации, находится в динамическом состоянии, в ней постоянно происходят процессы обновления входящих в ее состав веществ, адаптационные перестройки к изменяющимся условиям окружающей среды.

* *Остеобласты – это крупные (20–30 мкм в диаметре) округлые клетки с эксцентрично расположенным ядром и большим объемом цитоплазмы, содержат хорошо развитую гранулярную ЭПС, комплекс Гольджи и митохондрии, обладают высокой активностью щелочной фосфатазы. Функции остеобластов:*

1. *Секреторная (вырабатывают остеонектин, остеокальцин, коллаген I типа, хондроитинсульфаты, лимонную кислоту).*

2. *Участие в минерализации костной ткани за счет выделения щелочной фосфатазы.*

** *Остеокласты – это крупные многоядерные клетки (до 90 мкм), участвующие в резорбции органического и неорганического компонентов костной ткани. Резорбция костного матрикса осуществляется с помощью гидролитических ферментов: кислой фосфатазы, глицерофосфатазы, нитрофенилфосфатазы, фосфоамидазы, АТФазы. Расщепление органического вещества также происходит с помощью ферментов лизосомального происхождения.*

9. Остеоиндуктивные свойства перламутра

В последние годы разработке методов искусственного получения перламутра с использованием мантийной ткани двустворчатых моллюсков посвящено множество работ. Работы по использованию культуры ткани мантии проводятся преимущественно на морских моллюсках [6].

Остеоиндуктивные свойства перламутра in vitro. В России имеются огромные запасы пресноводных перламутробразующих раковин, в основном двух родов, *Anodonta* и *Unio*. Они распространены в реках практически по всей территории России, от Европейской части до Дальнего Вос-

тока. Моллюски родов *Anodonta* и *Unio* послужили прекрасным материалом для проведения работ по созданию экспериментальной модели биокристаллизации арагонита в культуре ткани мантии. Эта технология культивирования ткани мантии *in vitro*, разработанная российскими учеными во главе с профессором А.А. Сеид-Гусейновым, служит моделью и для изучения качественного состава органического матрикса, и идентификации отдельных групп белков перламутра, обладающих остеоиндуктивными свойствами. Доказана принципиальная возможность установления функционально-активной культуры ткани мантии пресноводных моллюсков. Из культивируемой *in vitro* ткани мантии мигрировали клетки различных типов: эпителиоподобные, фибробластоподобные и мелкие, округлые клетки, предположительно гемолимфы. В течение первых 24 часов культивирования мигрировавшие клетки формировали гетерогенный по составу клеточный слой, а в течение последующих 7–10 дней клетки продолжали высвобождаться из эксплантата мантии и образовывали плотный слой эпителиоподобных клеток вокруг эксплантата. В период с 3 по 40 сутки культивирования наблюдали образование и рост кристаллов арагонита в культуре ткани. Первые мелкие кристаллы арагонита идентифицировали уже на 3 сутки культивирования мантии моллюсков, а затем наблюдали их рост и слияние с образованием кристаллического слоя арагонита (рис. 15.4) под эксплантатом ткани мантии.

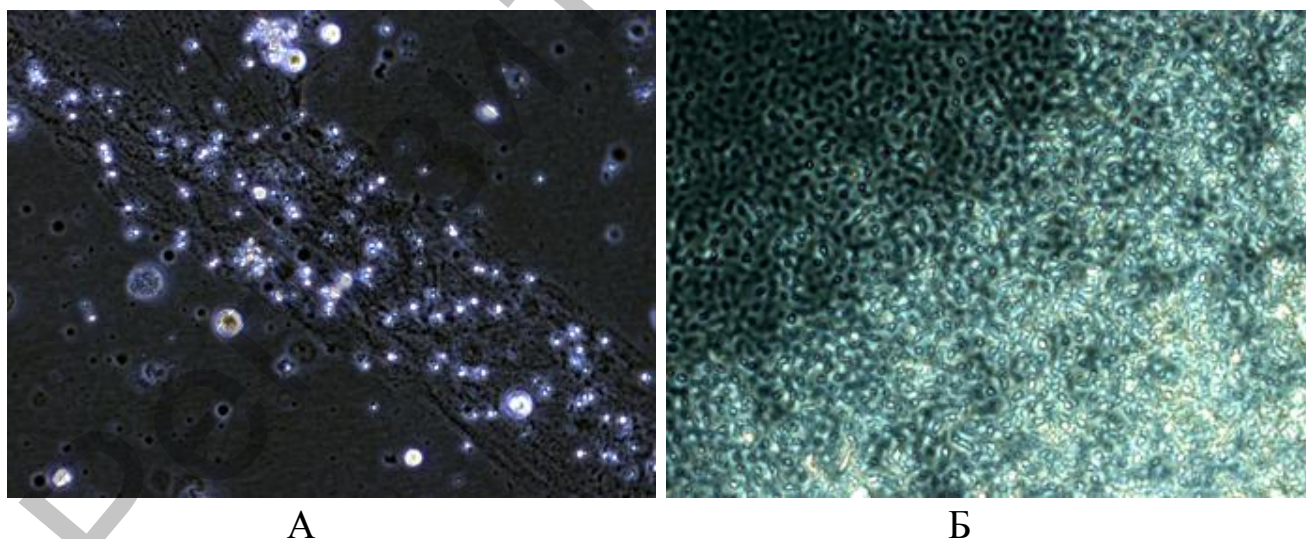


Рис. 15.4. Кристаллы арагонита, образованные в культуре мантийной ткани пресноводного моллюска. А. Кристаллы арагонита на 3 сутки культивирования. Ув. 40х. Б. Растущий слой кристаллов арагонита – формирование перламутрового слоя. Ув. 40х [3].

Green и коллеги продемонстрировали остеондуктивные свойства перламутра на клеточном уровне, а также показали способность подобного материала поддерживать прикрепление, дифференцировку, рост и миграцию человеческих остеопрогениторных клеток. (Остеопрогениторные клетки – популяция мультипотентных, мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, способная дифференцироваться как в организме, так и в клеточных культурах по остеогенному пути в хондроциты, остеобласты и стромальные фибробласты).

Для этого получили первичную культуру человеческих мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и высадили на следующие биологические образцы тканей или скелетов морских животных: коллаген морских губок, карбонат кальция шипов морского ежа – и на кусочки перламутра раковин моллюсков. В дополнение к этому первичную культуру человеческих мезенхимальных стволовых клеток костного мозга трансфицировали зеленым флуорисцентным белком (GFP).

Для обнаружения остеоиндуктивного потенциала и модуляции фенотипа остеобластов гистологию биологических образцов и измерение специфической активности щелочной фосфатазы (ЩФ) проводили на 4, 7, 14 и 28 дни культивирования. Остеоиндуктивный потенциал этих натуральных материалов исследовали, используя клеточную линию промиобластов C2C12. В результате было показано, что экспрессия щелочной фосфатазы усиливалась в большей степени в присутствии образцов перламутра, в клеточной линии промиобластов, в течение 14 дней культивирования, что подтверждает остеоиндуктивный потенциал перламутра. С помощью флуорисцентной микроскопии было показано наличие в образцах перламутра человеческих мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, экспрессирующих GFP.

Это исследование демонстрирует остеоиндуктивные свойства перламутра на клеточном уровне и возможность селекции природных материалов для модуляции активности остеопрогениторных клеток человека. Доказана способность перламутра индуцировать процесс минерализации и формирования костной ткани в культуре человеческих остеобластов. В культуру остеобластов первого пассажа помещали кусочки перламутра моллюсков, что приводило к пролиферации и прикреплению их к поверхности перламутра. Индукция минерализации проявлялась преимущественно в скоплениях остеобластов, окружающих кусочки перламутра. Позднее ими были сформированы трехмерные образования в виде «узелков», состоящие из плотного костного матрикса с кубоидальными фибробластами

на периферии и остеоцитоподобными клетками в центре. Активные остеобласты характеризовались обширно развитым эндоплазматическим ретикуломом и образованием фибрилл коллагена. Внеклеточные коллагеновые волокна имели вид поперечно скрещенных лент, и значения их электрической плотности указывали на их минерализацию. Полученный результат показывает, что полную последовательность формирования костной ткани человека возможно воспроизвести при культивировании человеческих остеобластов в присутствии перламутра. Данная модель позволяет не только изучить дифференцировку остеобластов в культуре, но и механизмы индукции минерализации костной ткани.

Duplat и коллеги исследовали *in vitro* деградацию перламутра остеокластами. Активность остеокластов кролика была изучена на перламутре для оценки пластичности клеток, разрушающих кость, и их способности адаптироваться к биоминеральным материалам с различными органическими или минеральными составляющими, отличающимися от натурального субстрата – кости. Чистый перламутр был получен из раковин двусторчатого моллюска *Pinctada*. Стволовые предшественники из крови кроликов и зрелые остеокласты из кости кроликов культивировали на перламутровом субстрате. При этом предшественники остеокластов дифференцировались в остеокласты, способные разрушать перламутровый субстрат, но в целом эффективность разрушения перламутрового субстрата была ниже, чем костной ткани, и лимитировала данный процесс.

Перламутр действует на процесс остеогенеза водорастворимых регуляторных белков органического матрикса.

Исследования в области регенерации костной ткани с применением компонентов перламутра моллюсков проводились F. Moutahir-Belqasmi в 2001 году. В данной работе был показан эффект влияния водорастворимого экстракта перламутра (*Pinctada maxima*), на активность щелочной фосфатазы и экспрессию Bcl-2 в первичной культуре остеобластов свода черепа новорожденных крыс. (Bcl-2 – анти-апоптотический белок, ингибирует каспазы и программируемую клеточную смерть, позволяя многим типам клеток выживать *in vivo*, а также блокирует апоптоз, индуцированный ксенобиотиками и радиацией (Reed, 1994). Увеличение концентрации Bcl-2 в цитоплазме зависит от стадии развития клетки. В высоких концентрациях Bcl-2 находится в цитоплазме остеобластов, остеоцитов и хондроцитов).

Первичная культура остеобластов была получена при помощи многократной ферментативной обработки париетальных костей черепа новорожденных крыс. Эти клетки имели характеристики остеобластов: высокая

активность щелочной фосфатазы (ЩФ), синтез коллагена типа I, изменение концентрации цАМФ и внутриклеточного кальция в ответ на действие парашитовидного гормона и ответ остеокальцином на 1,25-дигидроксивитамин D₃. Остеобласты крысы первичной культуры способны не только пролиферировать, но и развиваться в зрелые остеобласты, которые формируют минеральные островки. Созревание же остеобластов связано с временной экспрессией генов, кодирующих ростовые факторы и фенотипические маркеры. Уже на ранних стадиях развития этих клеток присутствие ЩФ является индикатором их дифференцировки. Высокая активность ЩФ является главным фенотипическим маркером остеобластов. Другие же типы клеток, к примеру, фибробласты, имеют низкую активность ЩФ.

Лиофилизированный экстракт перламутра *Pinctada maxima* добавляли в культуру остеобластов крысы в различных концентрациях. Воздействие экстракта перламутра на культуру остеобластов крысы оценивали по двум параметрам: 1) по активности щелочной фосфатазы (ЩФ), которая является главным маркером при фенотипировании остеобластов; 2) по уровню экспрессии анти-апоптотического белка, кодируемого про-онкогеном Bcl-2, который наряду с щелочной фосфатазой характерен для клеток кости, остеобластов и остеоцитов *in vivo*.

Эффект экстракта перламутра на активность ЩФ оказался дозозависимым. При концентрации экстракта 50 мкг/мл происходило максимальное увеличение активности ЩФ (20-кратное), а при концентрации 100 мкг/мл активность снижалась до 7-кратной. В то же время уровень синтеза Bcl-2 многократно увеличивался при концентрации экстракта перламутра 100 мкг/мл. Рост концентрации Bcl-2 в цитоплазме зрелых остеобластов увеличивает продолжительность жизни зрелых остеобластов, а также усиливает остеобластическую синтетическую активность, на что указывает усиление активности ЩФ.

Таким образом, было показано, что водорастворимый экстракт перламутра влияет на дифференцировку и созревание остеобластов в первичной культуре, а также на длительное выживание зрелых остеобластов, поддерживая их остеобластические свойства. Экстракт может, по видимому, влиять на клеточный цикл за счет связывания Bcl-2 с хромосомами и воздействовать на генную транскрипцию.

В работе французских и португальских ученых была показана способность водорастворимого матрикса перламутра двустворчатого моллюска *Pinctada maxima* увеличивать активность ЩФ в культуре костного мозга молодых крыс и культуре MRC-5 человеческих эмбриональных фибробла-

стов ткани легкого. Было показано, что водорастворимый экстракт перламутра обеспечивает увеличение активности ЩФ не только в зависимости от дозы экстракта, но и от времени экспозиции в культуре клеток. Данный экстракт в концентрациях 135 и 540 мкг белка/мл обеспечивает клеточную пролиферацию и усиление активности ЩФ в культуре костного мозга крысы. Эмбриональные фибробласты MRC-5 в культуре отвечали на действие водорастворимого экстракта перламутра также усилением активности ЩФ.

Природный перламутр морских и пресноводных моллюсков обладает целым рядом стимулирующих воздействий на остеогенез посредством сигнальных молекул. Из перламутрового слоя жемчужной устрицы (*Pinctada fucata*) был выделен матричный белок p10, способный усиливать ядрообразование кристаллов карбоната кальция и индуцировать формирование арагонита. Поскольку перламутр содержит остеогенные факторы, для изучения биологической активности белка p10 были взяты 2 минералогенные клеточные линии: фибробласты MRC-5 и преостеобласты MC3T3-E1. В результате было показано, что белок p10 увеличивает активность щелочной фосфатазы, раннего маркера дифференцировки остеобластов, и не влияет на жизнеспособность клеток. Таким образом, белок p10 из перламутрового слоя необходим для дифференциации клеток и протекания процесса биоминерализации.

Перламутр способен не только инициировать образование новой костной ткани, но и направлять клеточную дифференцировку по заданному пути. К такому выводу пришли израильские ученые, изучив превращение адипогенного (преадипоциты) клеточный фенотипа в остеогенный (остеобласты). Была показана дифференцировка клеточной линии преадипоцитов (3T3F442A) в клетки, способные формировать кость, растущие на 3D-биоматрице на основе морского карбоната кальция, без добавления каких-либо индукторов морфогенеза кости. Уже на вторые сутки после высаживания преадипоцитов на биоматрицу регистрировали процессы, типичные для остеогенного фенотипа. Это указывает на то, что кристаллическая биоматрица частично обладает трехмерной топологией или поверхностными параметрами, обеспечивающими быструю клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку преадипоцитов по остеогенному фенотипу.

Остеоиндуктивные свойства перламутра *in vivo*. Перламутр (*Pinctada maxima*) стимулирует дифференцировку клеток кости и ее формирование как *in vitro*, так *in vivo*. При трансплантации фрагментов перламутра в искусственно подготовленные полости в кости животных наблюдали постепенное растворение перламутра и увеличение активной клеточ-

ной популяции, способной регенерировать костную ткань. Экспериментальные полости заполнялись через 12 недель новыми, зрелыми трабекулами на месте растворенного перламутра. Подобный эксперимент свидетельствует о том, что перламутр содержит одну или более сигнальных молекул, способных активировать остеогенные костномозговые клетки.

При помещении в мышиную бедренную кость цилиндрического имплантата перламутра по истечении 14 дней после операции имплантат был связан с новой костной тканью. Остеобласты в этом случае располагались вдоль дистальной поверхности сформированной кости и давали положительный результат при гибридизации *in situ*, тремя РНК пробами, комплементарными к РНК коллагена I типа, остеонектина и остеокальцина. В качестве контроля в данном эксперименте был использован титано-гидроксиапатитный композит. Костный матрикс, который откладывался на поверхности перламутрового имплантата, не формировался на поверхности титано-гидроксиапатитного композита. В итоге, при помощи иммуногистологических методов было показано, что перламутр является биоактивным природным композитом и в отличие от инертного титано-гидроксиапатитного композита вызывает формирование новой костной ткани уже на 14 сутки пребывания в полости костного дефекта.

Возможность применения перламутра как биоматериала для костного замещения в ортопедической хирургии исследовали французские ученые. Для этого имплантаты перламутра были помещены в бедренную кость овец на 3 месяца. Как показало гистологическое исследование кости, имплантат не подвергался усиленной деградации и отсутствовала реакция отторжения. При помощи световой микроскопии было установлено, что слой предшественников костных клеток располагался вдоль имплантата и в следствии функциональной активности выполнял всю последовательность действий, связанных с формированием новой кости. Имплантат перламутра оказался непосредственно связанным с вновь образованной костью без вмешательства фиброзных тканей. Подобные результаты позволяют предположить возможность применения в ортопедической хирургии.

Исследования по способности инициировать образование костной ткани проводились не только с нативным перламутром, но и с декальцифицированными перламутровыми образцами. Японские ученые исследовали декальцифицированный перламутр в культуре клеток для изучения его остеиндуктивного потенциала. Уже через 72 часа после помещения кусочков декальцифицированного перламутра в культуру остеобластов, было показано наличие вновь образованного биоматрикса в фазе соприкосновения

перламутр-остеобласты. Отсюда следует, что декальцифицированный перламутр обладает определенным индуктивным потенциалом для формирования кости.

В настоящее время в области травматологии и ортопедии все чаще для восстановления костных дефектов применяют композитные скэффолды. Исследователями из группы Mingen Xu было показано, что композитный скэффолд на основе перламутра/поли(лакто- или гликолиевой кислот) в культуре мезенхимальных стволовых клеток способствует их адгезии, пролиферации и дифференцировке в остеобласты. Данные результаты были подтверждены методами иммунофлуорисцентного окрашивания, измерения активности ЩФ и ПЦР в реальном времени. Данный тип композитных скэффолдов является биосовместимым и обладает остеоиндуктивным потенциалом.

Показано, что перламутровый слой раковин двустворчатых моллюсков способен инициировать формирование кости как *in vivo*, так и *in vitro*. Он является биосовместимым материалом и обладает остеогенными свойствами.

Свойства перламутра в целом и отдельных его белковых или минеральных компонентов исследуются не только *in vitro*, но и на животных моделях. На основании экспериментальных данных были сделаны заключения о способности перламутра двустворчатых моллюсков и его частных компонентов стимулировать клеточную дифференцировку и способствовать регенерации костной ткани.

Натуральные раковины моллюсков являются идеальной основой для тканевой инженерии с целью обеспечения структурного микроокружения, аналогичного кости, подразумевающего необходимую архитектуру для васкуляризации, инвазии клеток кости и ангиогенеза. Перламутр может применяться как ортопедический наполнитель, обладающий остеоиндуктивным потенциалом, связанным с его структурными свойствами.

Исследования в области регенерации костной ткани с помощью перламутра или его компонентов находятся лишь на начальной стадии, поэтому для формирования целостного понимания картины биоминерализации и индукции остеогенных процессов необходимо продолжать исследовать активные белковые или минеральные компоненты в составе природного перламутра.

Лабораторная работа № 1

Остеоиндуктивные свойства водорастворимого экстракта перламутра

Цель: оценить влияние водорастворимого экстракта перламутра на активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в первичной культуре остеобластов крысы.

Задачи:

1. Получить первичную культуру остеобластов свода черепа новорожденных крыс.
2. Получить водорастворимый экстракт перламутрового слоя раковин двустворчатых моллюсков.
3. Измерить активность щелочной фосфатазы (ЩФ) на культуре остеобластов, подвергнутых воздействию экстракта перламутра.

Материалы и методы:

1. Культура остеобластов свода черепа новорожденных крыс.

Остеобласты изолируют из париетальных костей новорожденных крыс, для этого кости подвергают последовательной ферментативной обработке коллагеназой (стоковый раствор 1,5 мг/мл). Полученные клетки первичных остеобластов культивируют в питательной среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-Глутамин в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C. Для получения статистически достоверной выборки измерение изменения активности ЩФ проводят в 96-луночных планшетах.

2. Водорастворимый экстракт перламутра.

Диализованный и лиофилизированный водорастворимый экстракт перламутрового слоя раковин двустворчатых моллюсков используют для изменения активности ЩФ.

3. Измерение активности щелочной фосфатазы.

Активность щелочной фосфатазы измеряют *in situ* в микропланшетах. Для этого клетки высаживают в 96-луночный планшет в количестве 3,000 клеток/лунку. К конфлюэнтному слою клеток остеобластов добавляют водорастворимый экстракт перламутра в концентрациях 100, 50, 25, 1 мкг белка/мл на 48 часов. Рекомендуется 4 восьмилуночные группы, две по краям планшета и две в центре использовать в качестве контрольных. Два оставшихся блока по 4 восьмилуночные группы заполняют экстрактом с убывающей концентрацией. По истечении контрольного срока питательную среду из лунок планшета удаляют, затем клетки дважды отмывают

Tris-HCl буфером (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) и добавляют к клеткам субстрат ЩФ (пара-нитрофенилфосфат, 1,33 мг/мл, 0,2 мл/лунка). Планшеты инкубируют 30 минут при температуре 37 °С. Количество гидролизованного пара-нитрофенилфосфата измеряют на спектрофотометре при длине волны 405 нм. Активность ЩФ оценивали по количеству высвобожденного пара-нитрофенилфосфат/мин/клеток и выражали в относительных оптических единицах.

Результаты:

Увеличение активности фермента щелочной фосфатазы по сравнению с контролем регистрируют при добавлении водорастворимого экстракта перламутра в культуру остеобластов крысы, в концентрации 50 и 100 мкг/мл.

Лабораторная работа № 2

Остеоиндуктивный потенциал эксплантатов перламутра

Цель: оценить остеоиндуктивный потенциал эксплантатов перламутра *in vitro* в культуре мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека.

Задачи:

1. Получить культуру МСК костного мозга человека.
2. Получить стерильные эксплантаты перламутра раковин двустворчатых моллюсков.
3. Измерить уровень экспрессии остеокальцина, остеоонектина, коллагена I типа в МСК костного мозга человека методом ПЦР.

Материалы и методы:

1. Культура МСК костного мозга человека.

Суспензию МСК костного мозга человека получают путем множественных аспирации из задних бугров и гребней подвздошной кости, проводимых под эндотрахеальным наркозом. При этом количество костномозговой суспензии составляет 1500–2000 мл. Затем костномозговую взвесь высаживают из расчета 3 млн клеток на культуральный флакон 25см² в ростовую среду DMEM/F-12 с добавлением 15% ЭТС, 4% гентамицина и 2 mM L-глутамин и переносят в СО₂-инкубатор (37 °С). Через 48 часов проводят полную смену ростовой среды для удаления неприкрепленных клеток, а впоследствии смену ростовой среды проводят каждые 3–5 дней, добавляя в культуральный флакон только половину свежей среды DMEM/F-12. Фракция МСК костного мозга проявляет хорошие адгезивные свойства к куль-

туральному пластику и не удаляется при смене ростовой среды. При достижении клетками монослоя проводят пассирование культуры МСК, используя трипсин 0,25% и раствор Версена. Полученную суспензию МСК переносят в новый культуральный флакон в количестве 300 тысяч клеток, в который помещены кусочки стерильного перламутра и культивируют в течение 21 суток.

2. Перламутровые эксплантаты.

Эксплантаты перламутра раковин двустворчатых моллюсков, размером 0,5×0,5 см стерилизуют либо погружением в 70% этиловый спирт на 10 минут и дают высохнуть, либо автоклавированием и в дальнейшем используют в культуре МКС костного мозга.

3. Метод ПЦР и обратной транскриптазы.

Анализируют экспрессию генов остеокальцина, остеоонектина, коллагена I типа с помощью ПЦР на 21 сутки культивирования перламутра в системе МСК костного мозга человека.

Таблица 15.1 – Описание праймеров и проб

<i>Ген</i>	<i>Номер гена в GenBank</i>	<i>Прямой праймер</i>	<i>Обратный праймер</i>	<i>ПЦР продукт (пар нуклеотидных оснований)</i>
Остеокальцин	NM199173 NM000711	ATGAGAGCCCTCACA CTCCTC	CGTAGAAGCGCCG AT AGGC	291
Коллаген I типа	BC036531	GATGGATTCCAGTTC GAGTAT G	GTTTGGGTGCTTG TCTG TTTG	479
Остеонектин	BC072457 BC004974	AGTAGGGCCTGGATC TTC TT	CTGCTTCTCAGTCA G AAGGT	575

Получают тотальную РНК культивируемых клеток, используя реагент TRIzol (фирма Invitrogen). Затем 1 мкг полученной тотальной РНК клеток костного мозга подвергают действию фермента ревертазы (обратная транскриптаза), используя 25 мМ буфер Tris-HCl (pH 8,3), 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 2 мМ DTT, 1 мМ дезоксинуклеотидтрифосфата каждого, 40 мкг/мл праймера dT15 b 200 Ед/мл (AMV RT) обратную транскриптазу в конечном объеме 25 мкл. Затем суспензию инкубируют 40 минут при тем-

пературе 42 °С. Реакцию обратной транскрипции останавливают нагреванием до температуры 95 °С в течение 5 минут. Для проведения ПРЦ используют 5% полученной кДНК. Реакцию проводят в 10 мМ буфере Tris-HCl (рН 8,3), 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,2 мМ дезоксинуклеотидтрифосфата каждого, 0,5 мМ каждого праймера (табл. 15.1.) и 1,25 Ед Taq полимеразы в конечном объеме реакционной смеси 50 мкл.

ПЦР реакция проводится циклами (цикл – 94 °С – 45 секунд; 60 °С – 45 секунд и 72 °С – 1 минуту); всего 30 циклов. ПЦР продукты анализируют в 1% агарозном геле, окрашенном этидиум бромидом.

Результаты:

Через 21 день культивирования перламутровых эксплантатов в культуре МСК костного мозга человека, проводят ПРЦ и регистрируют экспрессию генов остеокальцина, остеоонектина и коллагена I типа, а также оценивают количественные показатели изменений.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте химические вещества арагонит, кальцит и ватерит.
2. Опишите компоненты органического матрикса костной ткани.
3. Как происходит процесс биоминерализации?
4. Какие белки участвуют в кристаллизации арагонита в перламутровом слое?
5. Какие белки входят в состав минерально-органической системы раковин моллюсков?
6. Какова возможная модель кристаллического роста в перламутровом слое?
7. Каковы особенности минерализации кости человека?
8. Приведите доказательства остеоиндуктивных свойств перламутра *in vitro*.
9. Приведите доказательства остеоиндуктивных свойств перламутра *in vivo*.
10. Как исследуют остеоиндуктивные свойства водорастворимого экстракта перламутра?
11. Как можно оценить остеоиндуктивный потенциал эксплантатов перламутра?
12. Какое значение имеют методы ПЦР и обратной транскриптазы в оценке остеоиндуктивного потенциала?

Литература

1. Голубев, С.Н. Реальные кристаллы в скелетах кокколитофорид / С.Н. Голубев. – М.: Наука, 1981, 164 с.
2. Ковтун, Н.Е. Разработка модели биокристаллизации для изучения процессов ускоренного остеогенеза с использованием культуры ткани мантии моллюсков / Н.Е. Ковтун [и др.] // Хирургия. – 2007. – № 12. – С. 3–6.
3. Ковтун, Н.Е. Экспериментальная модель биокристаллизации арагонита в культуре ткани мантии моллюска / Н.Е. Ковтун [и др.] // Медицина критических состояний. – 2008. – № 2. – С. 36–38.
4. Сеид-Гусейнов, А.А. Перспективы применения биотехнологии на основе перламутра и его белковых компонентов с целью восстановления костной ткани / А.А. Сеид-Гусейнов [и др.] // Вестник трансплантологии искусственных органов. – 2008. – № 4. – С. 61–63.
5. Сребродский, Б.И. Жемчуг / Б.И. Сребродский. – М.: Наука, 1985. – С. 31–42, 46–56.
6. Barik, S.K. CaCO_3 crystallization in primary culture of mantle epithelial cells of freshwater pearl mussel / S.K. Barik [et. al.] // Science. – 2004. – Vol. 86, № 5. – P. 730–733.
7. Belcher, A.M. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins / A.M. Belcher [et. al.] // Nature. – 1996. – Vol. 381. – P. 56–58.
8. Duplat, D. The in vitro osteoclastic degradation of nacre / D. Duplat [et. al.] // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26, № 15. – P. 2767–2773.
9. Fritz, M. The formation of highly organized biogenic polymer/ceramic composite materials: the high-performance microaluminate of molluscan nacre / M. Fritz, D.E. Morse // Curr. Opin., Cell Biol. – 1998. – Vol. 3. – P. 55–62.
10. Green, D. Human osteoprogenitors attachment, growth and differentiation on marine invertebrate skeletons / D. Green [et. al.] // European Cells and Materials. – 2002. – Vol. 4. – P. 133–134.
11. Hattan, S. Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis* / S. Hattan [et. al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 4461–4468.
12. Matsushiro, A. Presence of Protein Complex is Prerequisite for Aragonite Crystallization in the Nacreous Layer / A. Matsushiro [et. al.] // Mar. Biotechnol. – 2003. – Vol. 5. – P. 37–44.

13. Marin, F. Mucins and molluscan calcification: molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the mussel *Pinna Nobilis* / F. Marin [et. al.] // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, № 27. – P. 20667–20675.
14. Shen, X. Molecular cloning and characterization of Lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens* / X. Shen [et. al.] // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – P. 32472–32481.
15. Suzuki, M. Characterization of Prismalin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the shell *Pinctada fucata* / M. Suzuki [et. al.] // Biochem. J. – 2004. – Vol. 382. – P. 205–213.
16. Thompson, J.B. Direct observation of the transition from calcite to aragonite growth as induced by abalone shell proteins / J.B. Thompson [et. al.] // Biophys. J. – 2000. – Vol. 79. – P. 3307–3312.
17. Zhang, Cen. A novel matrix protein p10 from the nacre of pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its effects on both CaCO_3 crystal formation and mineralogenic cells / Cen. Zhang // Biomaterials. – 2006. – Vol. 22(6). – P. 555–562.

Репозиторий ВГУ

Учебное издание

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ

*Допущено Министерством образования Республики Беларусь в качестве учебного пособия
для студентов и магистрантов высших учебных заведений по биологическим специальностям*

Под редакцией

СОЛОДКОВА Александра Петровича

ЧИРКИНА Александра Александровича

Технический редактор

А.И. Матеюн

Корректор

А.А. Дайнеко

Компьютерный дизайн

Г.В. Разбоева

Подписано в печать

2010. Формат 60х84¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Ризография.

Усл. печ. л. 22,32. Уч.-изд. л. 24,00. Тираж экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования

«Витебский государственный университет им. П.М. Машерова».

ЛИ № 02330 / 0494385 от 16.03.2009.

Отпечатано на ризографе учреждения образования

«Витебский государственный университет им. П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.

Таблица 11.1 – Блокаторы калиевых каналов, действующие на внешнюю поверхность гладкомышечных клеток

Тип калиевых каналов	Ba ²⁺	Глибенкламид	4-аминопиридин	Харибдотоксин, ибериотоксин	Тетраэтиламмоний (ТЭА)
K _V	Полумаксимальная блокирующая концентрация >1 мМ	Нет эффекта при 10 мкМ	Полумаксимальная блокирующая концентрация 0,2–1,1 мМ	Нет эффекта	Полумаксимальная блокирующая концентрация 10 мМ
K _{Ca}	Минимальный эффект при 10 мМ	Нет эффекта при 10 мкМ	Полумаксимальная блокирующая концентрация > 5 мМ	Полумаксимальная блокирующая концентрация > 1 мМ	Полумаксимальная блокирующая концентрация 0,2 мМ
K _{IR}	Полумаксимальная блокирующая концентрация 2 мкМ при -60 мВ	Нет эффекта при 10 мкМ	10% блокады при 1 мМ	Нет эффекта	Нет эффекта при 1 мМ
K _{ATP}	Полумаксимальная блокирующая концентрация 100мкМ при -80мВ	Полумаксимальная блокирующая концентрация 20–100 нМ	Полумаксимальная блокирующая концентрация 0,2 мМ	Нет эффекта	Полумаксимальная блокирующая концентрация 7 мМ

Примечание: ионы Ba²⁺ блокируют калиевые каналы в зависимости от величины мембранного потенциала с очевидной аффинностью увеличивающейся на каждые 24 мВ гиперполяризации. Харибдотоксин и ибериотоксин также действуют в потенциалзависимой манере и их эффект возрастает по мере увеличения гиперполяризации. Ионы ТЭА блокирует калиевые каналы при увеличении гиперполяризации мембраны.

Репозиторий ВГУ