

На правах рукопису

КАЛАШНІКОВА ЛАРИСА ЄВГЕНІВНА

**ЗВ'ЯЗОК ПОВЕРХНЕВОГО ЗАРЯДУ МЕМБРАНИ НЕЙТРОФІЛІВ З
ФУНКЦІОНУВАННЯМ КЛІТИННИХ СИГНАЛЬНИХ КАСКАДІВ.**

02.00.10 - Біоорганічна хімія, хімія природних
та фізіологічно активних речовин;

14.00.25 - Фармакологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1994

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі медико-біологічних проблем Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Наукові керівники:

доктор медичних наук,
професор, О.І.Луїк
кандидат біологічних наук
Р.М.Скрима

Офіційні опоненти:

доктор хімічних наук,
Г.С.Шаповал
доктор медичних наук,
професор В.Д.Лук'ячук

Провідна установа:

Інститут органічної хімії
НАН України,
м. Київ

Захист відбудеться "24" Травня 1994 р. на
засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.65.01 в Інституті
біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

(253660, м. Київ, вул. Мурманська, 1).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту
біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (253660, м. Київ,
вул. Мурманська, 1).

автореферат розісланий "24" Квітня 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Д.М.Федорук

Д.М.Федорук

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00810393 (0)

AB-29724

Актуальність проблеми. Зовнішні плазматичні мембрани, як відомо, є найважливішим структурно-функціональним елементом, який забезпечує біорегуляторні процеси в клітинах. У всіх біологічних реакціях беруть участь макромолекулярні структури мембран, що мають заряджені групи, які формують поверхневий заряд клітини, і, таким чином, обумовлюють їх електрокінетичні властивості. Чисельними дослідженнями [С.С.Харамоненко, А.М.Ракитянська, 1974, Мірошников А.А., 1986, Козинець Г.І., 1986] показано, що патологічні зміни клітинної активності та зміни властивостей клітини, зв'язаних з її віком, супроводжуються змінами поверхневого мембранного потенціалу.

Дослідженнями останніх років [В.П.Кухар, О.І.Луїк, 1991] показано, що всі найбільш важливі прояви клітинної активності опосередковані регулюючими механізмами, які здійснюють сприйняття, проведення і реалізацію зовнішнього сигналу клітиною. Найбільш важливими і універсальними є дві сигнальні системи: аденилатциклазна (АдЦ) і Са/поліфосфоінозитидна (Са/ПФІ), - для яких, в основному, відомі принципи організації і функціонування, а також характер регуляції ними клітинних відповідей. Проте, проблема регуляції вказаними месенджерними системами величини електричного заряду клітин залишається абсолютно невирішеною. Більше того, аналогічним чином питання практично не ставилось. Разом з тим, з'ясування процесів, які лежать в основі біохімічної регуляції величини електричного заряду клітинної поверхні, важливе не лише саме по собі, але і для розуміння молекулярних механізмів дії широкого кола лікарських речовин.

Зручним об'єктом для дослідження цієї проблеми є клітини білої крові - поліморфноядерні лейкоцити (ПМЯЛ), функціональна активність яких знаходиться під строго детермінованим контролем Са/ПФІ- і АдЦ-систем сигнальної трансдукції. Цінним інструментом для експериментального аналізу механізмів спряження мембранного потенціалу ПМЯЛ з клітинними сигнальними каскадами є фізіологічно активні речовини (ФАР), які проявляють відому за спрямованістю дію на ці каскади. При такій постановці дослідження вдається не тільки оцінити принципи управління клітинним потенціалом з участю головних месенджерних систем, але й одержати додаткову інформацію про механізми дії використаних ФАР на лейкоцити. Останнє має важ-

ливе значення з точки зору застосування цих речовин у клініці для лікування різних захворювань, в патогенезі яких ПМЯЛ відіграють важливу роль.

Мета роботи: вивчення механізмів регулювання поверхневого заряду клітин гранулоцитарного ряду білої крові головними месенджерними системами клітини при дії на них різних фармакологічних речовин, які моделюють функціональний стан клітини цими системами.

Задачі дослідження полягали у наступному:

1. Дослідити зміну електрофоретичної рухливості (ЕФР) нейтрофілів при впливі ФАР з відомою спрямованістю дії на універсальні клітинні системи сигнальної трансдукції: АдЦ і Са/ПФІ.

2. Виявити роль зовнішньомембранних рецепторів в процесі спряження систем клітинного біорегуляторного метаболізму з механізмами управління клітинним зарядом.

3. Порівняти вплив найбільш характерних фармакологічних агоністів і антагоністів головних месенджерних систем на електрокінетичні характеристики ПМЯЛ з дією тих же речовин на два види відповідей електробуджуваних клітин з відомим (гладком'язеві об'єкти) і невідомим (електрокеровані Са²⁺-канали нейронів молюсків) спряженням з реакціями сигнальних клітинних каскадів.

4. Розрахувати електрокінетичні характеристики ПМЯЛ - ζ-потенціал та густину поверхневого заряду мембрани (σ) - для інтактних клітин і при дії досліджуваних ФАР.

5. Провести кореляційний аналіз результатів визначення впливу ФАР на електрокінетичні властивості ПМЯЛ з ефектами тих же речовин на модельних відповідях клітин білої крові (хемокінез, хемотаксис, Е-розеткоутворююча здатність лімфоцитів з еритроцитами барана) і агрегації тромбоцитів.

6. Дослідити зміни електрокінетичних властивостей ПМЯЛ при патології і оцінити на цьому фоні характер впливу деяких фармакологічних речовин на ЕФР лейкоцитів (як моделі експериментальної патології використовували пошкодження іонізуючим випромінюванням).

Наукова новизна:

1. Вперше встановлено, що ФАР, об'єднані тільки спільною спрямованістю впливу на клітинні сигнальні каскади, проявляють і спільність дії на поверхневий заряд мембрани. При цьому, речовини, що активують АдЦ каскад та інгібують Са/ПФІ систему, знижують, а речовини протилежного типу дії - збільшують заряд поверхневої мембрани клітини.

2. Показано, що від'ємний електричний заряд мембрани нейтрофілів підтримується за рахунок активації Са/ПФІ і гальмування АдЦ системою сигнальної трансдукції і контролюється КТ-чутливими G-білками, незалежно від поступаючого на них зовнішнього сигналу.
3. Встановлено, що реєстрація ЕФР ПМЯЛ може бути достатньо інформативним методом для аналізу молекулярних механізмів дії фізіологічно активних речовин.
4. Розраховані коефіцієнти кореляції між ЕФР ПМЯЛ і досліджуваними показниками клітинної активності при впливі ФАР дозволяють зробити висновок, що визначним у дії ліків на вивчені функції клітини є загальний характер дії (активація або пригнічення) ліків на баланс активностей двох основних сигнальних систем клітини.
5. Запропоновано новий спосіб лабораторної діагностики променевого уражень, який використовується в практиці спеціалістами ВРМНЦ АН України.

Теоретичне й практичне значення роботи. Результати досліджень мають принципове значення для пояснення молекулярних механізмів реалізації фізіологічних функцій досліджуваних клітин, а також виявлення можливості спрямованої корекції їх активності при патологічних станах. Розрахунок електрокінетичних характеристик, що ґрунтується на виявлених закономірних змінах електрофоретичної рухливості ПМЯЛ при дії ксенобіотиків, дозволяє більш повно інтерпретувати біорегуляторні явища на молекулярному рівні.

Аналіз фізико-хімічних процесів, що лежать в основі спряження функціонального стану клітини і властивостей її плазматичної мембрани, дозволяє пояснити механізми дії лікарських та інших фізіологічно активних речовин. Це розширює межі застосування відомих фармакологічних препаратів і відкриває можливості створення нових лікарських засобів.

Виявлена спільність в принципах дії препаратів може бути використана в терапії патологічних станів, зокрема променевої хвороби. Одержані дані поглиблюють уявлення про патогенетичні механізми розвитку променевої хвороби і сприяють вдосконаленню схем і способів діагностики та лікування даної патології.

Реалізація одержаних результатів. На основі проведених досліджень запропонований новий спосіб лабораторної діагностики променевого уражень, який використовується з 1989 року у ВРМНЦ, розроблені ре-

комендації по підвищенню ефективності способів діагностики та схем лікування даної патології.

Апробація результатів роботи. Основні результати роботи доповідались і обговорювались на I Всесоюзній конференції з нейронаук (Київ, грудень 1986); на IV конференції молодих вчених м.Києва "Актуальні питання фармакології і токсикології" (1987); на Всесоюзному симпозиумі "Біохімія-медицині" (Ленінград, 1988); на щорічних наукових конференціях ІБОНХ АН України; на наукових семінарах відділу медико-біологічних досліджень і на засіданнях Вченої ради ІБОНХ (1994 р).

Робота Калашникової Л.Є., Дегтяра В.Є., Поди Г.І. "Стереотипні механізми дії фізіологічно активних речовин в межах універсальних систем сприйняття, проведення і реалізації зовнішніх сигналів клітиною" посіла друге місце на Всесоюзному огляді-конкурсі серед молодих вчених і спеціалістів в галузі фармакології в 1988 році.

За матеріалами дисертації опубліковано 9 друкованих робіт. Результати досліджень використані в фундаментальній монографії "Хімія біорегуляторних процесів" (ред. В.П.Кухар, О.І.Луйк, 1991), яка є вступом до нового спеціального розділу біоорганічної хімії.

Об'єм і структура дисертації. Дисертація викладена на 155 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, огляду літератури (5 розділів), результатів досліджень (5 розділів), закінчення, висновків, списку літератури та додатку. Робота проілюстрована на 40 малюнками і 5 таблицями. Список літератури нараховує 130 першоджерел.

1. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вибір ФАР та принципи поділу на групи.

Для аналізу механізмів спраження електрокінетичних характеристик ПМЯЛ з функціями головних месенджерних каскадів використовували ФАР з відомою направленістю дії на останнє. Згідно класифікації лікарських речовин (О.І.Луйком та ін., 1991), переважну більшість ФАР можна поділити по направленості дії на головні системи сигнальної трансдукції на активатори (+) та пригнічувачі (-) аденілатциклазної (I) або поліфосфоінозитидної (II) системи. Ці ефекти прийнято позначати "+I", "-I", "+II" та "-II", відповідно. Таким чином, речовини можна розділити на дві основні категорії із

стереотипними поєднаннями ефектів типу "+I/-II" та "-I/+II", тобто речовини, що активують проведення сигналу в АДД-системі і одночасно гальмують Са/ПФІ-каскад, і речовини із зворотним поєднанням дій на головні месенджерні системи.

Всі досліджувані в роботі речовини, різні як по своїй хімічній будові, так і по фармакологічних властивостях, за однією або декількома ознаками механізмів їх дії були віднесені до однієї з двох виділених вище категорій. Вибрані ФАР в експериментах використовувались в діапазоні концентрацій від $5 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л. При цьому у більшості випадків спостерігались однонаправлені ефекти, тому для них в роботі приведені тільки результати дослідів з концентрацією $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л як найбільш достовірні і з'ясовані.

Метод клітинного електрофорезу. Об'єктом дослідження були поліморфноядерні лейкоцити (ПМЯЛ) крові щурів породи Wistar, виділені із гепаризованої крові в градієнті центрифугування фікол-верографін. Мертві клітини склали не більш 3-5%

Принцип методу електрофорезу детально описаний в роботі Є.В.Долгой (1985). Результати експериментів представлені як середні значення електрофоретичної рухливості. Достовірність отриманих результатів оцінювали статистично по методу Ст'юдента.

Метод внутріклітинної перфузії. Дослідження проводили на неідентифікованих ізольованих нейронах виноградного слимака *Helix pomatia*.

В дослідженнях був застосований метод внутріклітинної перфузії, розроблений для дослідження іонної провідності плазматичних мембран нейронів молюсків [Костик П.Г., Кришталь О.А., 1977].

Метод реєстрації скоротливої активності гладких м'язів. Як об'єкт дослідження використовували смужки із сечовода морської свинки і рогів матки вагітних щурів породи Wistar. Для дослідження гладком'язевих препаратів сечовода морської свинки застосовували метод подвійного сахарозного містка [Mugridge K.G., 1984], а препарати матки досліджувались методом, описаним у роботі [Р.М.Скрима та ін., 1987].

Метод моделювання променевих уражень. Досліди проводили на щурах породи Wistar вагою 150-200 г. Опромінення здійснювали одноразово з експозиційною дозою 250 Р за 2 хв на апараті РУМ за наступних умов: $U=180$ кВ, $I=15$ мА; відстань джерело-поверхня - 30 см;

Фільтри - 0,5 Си+1 мм Al. Вимірювання ЕФР проводили методом мікроелектрофорезу через 1 і 4 доби після опромінення. Паралельно з ЕФР визначали загальноприйнятими методами сумарну кількість лейкоцитів і лейкоцитарну формулу. Досліджувані препарати вносили в кров опромінених тварин *in vitro*.

Клінічні дослідження проводились у 1986-1987 р.р. на базі ВРНЦ АМН СРСР. Під спостереженням знаходилось 58 осіб чоловічої статі віком від 30 до 65 років, які були опромінені іонізуючою радіацією при виконанні робіт по ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС. Визначення ЕФР ПМЯЛ цих людей проводили методом мікроелектрофорезу.

Обчислювальні методи. Обчислення величин ζ -потенціалу і густини поверхневого заряду мембрани здійснювали за допомогою програми Matchad. Для кореляційного аналізу та статистичної обробки експериментальних результатів використовували програму Statgraf. Побудова графіків і гістограм здійснювалась графічним редактором "CoPLOT".

2. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТІВ.

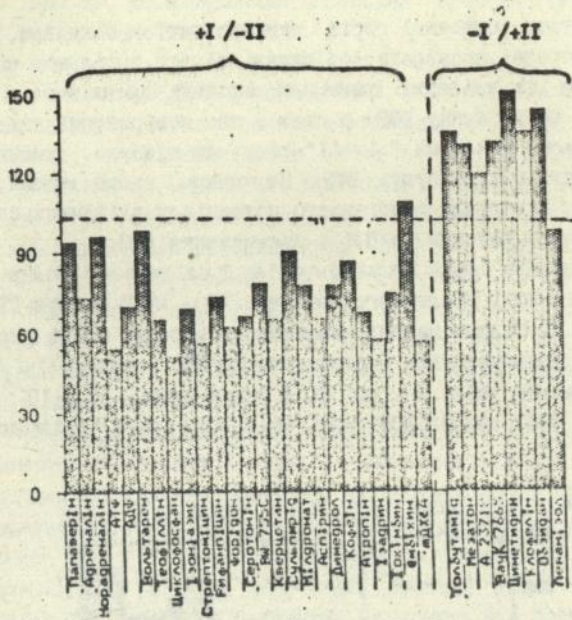
2.1. Мікроелектрофоретичне дослідження нейтрофілів.

Для вивчення залежності поверхневого заряду мембрани ПМЯЛ від активності досліджували зміни ЕФР ПМЯЛ під впливом ФАР з відомими стереотипами дії на месенджерні каскади.

Згідно з отриманими даними (мал.1), дія на нейтрофіли різних ФАР приводить, в більшості випадків, до змін їх ЕФР в порівнянні з контролем. Ці зміни відрізняються як по ступеню вираженості, так і по направленості дії.

Було встановлено, що речовини групи "+I/-II" знижують величину ЕФР досліджуваних клітин на 22-49%. Виняток складають папаверин, норадреналін, вольтарен, кофеїн та ембіхін, які не проявили достовірного впливу на досліджуваний показник.

Для перших чотирьох із перелічених вище п'яти препаратів, відсутність дії можна пояснити їх неоднозначним впливом на активність клітинних сигнальних каскадів. Одночасно ембіхін є класичним представником "+I/-II" групи. Але, цей агент, який використаний в наших дослідях у формі гідрохлориду, при фіксації на мембрані ПМЯЛ в високих концентраціях може надати їй додатковий негативний заряд. Це підтвердили експерименти, в яких даний препарат досліджувався в діапазоні концентрацій $5 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Зниження концентрації у вказаному діапазоні приводило до



Мал.1. Вплив досліджуваних ФАР на електрофоретичну рухливість ПМЯЛ крові щурів.

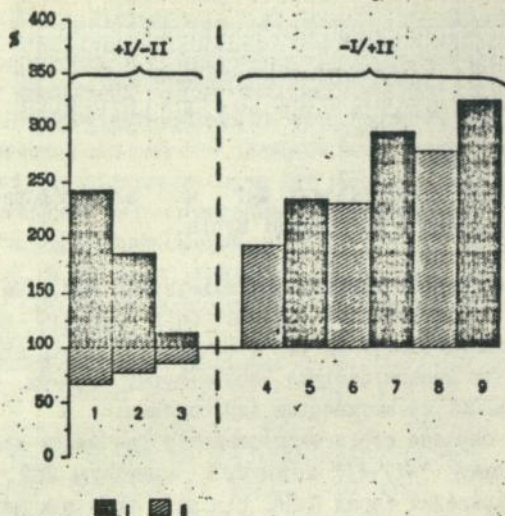
інверсії ефектів від підвищення до гальмування ЕФР. Це дає змогу допустити, що при зниженні концентрації ембіхіну зменшується вплив його власного заряду на ЕФР і починають проявлятися залишкові (при даних концентраціях) пригнічуючі ефекти, обумовлені гальмуванням Са/ПФІ та активацією АДЦ-системи.

В цілому, описана серія експериментів дає змогу зробити висновок, що речовини "+I/-II" категорії зменшують ЕФР, а також і негативний поверхневий заряд ПМЯЛ. Під дією всіх цих фармпрепаратів "-I/+II" групи: толбутаміду, мезатону, обзидану, клонідину, левамизолу, іонофору А 23178 і Ваук 8644, відбувалось достовірне збільшення показника клітинної активності на 19-78% відносно контрольного значення. Виняток склав левамизол, який не проявив достовірної дії на ЕФР нейтрофілів. Отже, речовини цієї групи здатні спричиняти достовірне збільшення величини поверхневого заряду досліджених клітин.

Результати описаної серії експериментів показали, що настільки різні препарати, об'єднані тільки загальною спрямованістю впливу на клітинні сигнальні каскади проявляють і спільність в дії на величину ЕФР, а отже і на поверхневий заряд мембрани. При цьому речовини "+I/-II"-типу, як правило, зменшують, а "-I/+II"-типу - підвищують ЕФР. На основі цього можна зробити висновок, що генерація мембранного потенціалу здійснюється за рахунок активації системи Са/ПФІ і гальмування АдЦ.

В наступній серії експериментів досліджували вплив на ЕФР клітин білої крові кокличного токсину (КТ), який блокує ГТФ-зв'язуючі білки (G-білки) цитоплазматичної мембрани, котрі проводять сигнали, що гальмують АдЦ і активують Са/ПФІ -каскад ("I/+II").

Встановлено (мал. 2), що КТ в концентрації $1,0 \cdot 10^{-7}$ моль/л істотно (на 66%) знижує ЕФР ПМЯЛ. Це підтверджує зроблений вище



Мал. 2. Вплив досліджуваних Ca^{2+} на ЕФР нативних ПМЯЛ і на фоні обробки клітин КТ. По осі ординат відносні (%) зміни ЕФР на нативних (I) і попередньо оброблених КТ (II) ПМЯЛ; 1 - атропін; 2 - димедрол; 3 - кофеїн; 4, 5. - толбутамід; 6, 7 - Вау К 7665; 8, 9 - циметидін.

висновок про те, що мембранний потенціал зростає при активації Са/ПФІ і гальмуванні АдЦ-каскаду.

Були проведені також дослідження спільної дії КТ і різних ФАР, що використовувались в попередніх експериментальних серіях. КТ і досліджувані агенти використовувались в попередніх діючих концентраціях. Експериментально встановлено, що на фоні пригнічення ЕФР, викликаного дією КТ, препарати обох груп: як "+I/-II", так і "-I/+II", - викликають підвищення мембранного потенціалу ПМЯЛ. Таким чином, для речовин групи "+I/-II" відбувається обернення ефекту від гальмування ЕФР на інтактних клітинах до активації на лейкоцитах, оброблених КТ. Речовини категорії "-I/+II" підвищують ЕФР в обох випадках: як нативних, так і оброблених КТ. Проте на клітинах, що були під дією КТ, їх ефект виражений значно більше ніж на інтактних ПМЯЛ.

Як встановлено [О.І.Луйк, В.П.Кухар, 1991], за відсутності біорегуляторного стимулу "-I/+II" категорії КТ не впливає на функціональну активність ПМЯЛ, що оцінюється по їх хемотаксичній або хемокінетичній активності. З цього випливає, що механізм підтримання електровід'ємного мембранного потенціалу нейтрофілів контролюється, на відміну від інших функцій цього виду клітин білої крові, КТ-чутливими G-білками незалежно від поступаючого на них зовнішнього сигналу.

Із сказаного вище можна зробити висновок, що від'ємний мембранний потенціал ПМЯЛ підтримується шляхом активації системи Са/ПФІ і пригнічення АдЦ-месенджерного каскаду. Суттєву роль в цьому регуляторному механізмі грає базальна функціональна активність чутливих G-білків.

2.2. Вплив досліджуваних речовин на електрозбуджувані клітини.

На цьому етапі роботи досліджували ефекти речовин тих же груп на потік Ca^{2+} через електрочутливі кальцієві канали мембрани нейрона молюска. Враховуючи особливості електрофізіологічного експерименту на даному об'єкті не уявлялося можливим детально оцінити всі сполуки, досліджені на ПМЯЛ. Тому в дослідгах на нейронах *Helix pomatia* досліджували тільки деякі найбільш характерні речовини. Такими для групи "+I/-II" були вибрані атропін, димедрол, BW 755C, ембіхін, теофілін. Серед представників протилежного класу ФАР досліджували обзидан, клофелін і толбутамід.

Встановлено, що атропін при аплікації ззовні мембрани зворотньо блокує кальцієвий потік з $IC_{50} = 1,4 \pm 0,4$ мМ. Графік доза-

-ефект має круту концентраційну залежність, яка відповідає біомолекулярному сполученню або реакції більш високого порядку. Блокада при низьких концентраціях, як правило, повністю зворотня з врахуванням поступового спадання Ca^{2+} -струму в ході внутріклітинної перфузії.

При внутріклітинному застосуванні атропін практично не впливає на електрокерований потік кальцію в мембранах нейронів молюска.

Це стосується і блокатора H_1 -рецепторів гістаміну димедрола, який при зовнішньому прикладанні оборотно блокує потенціалкерований потік Ca^{2+} через відповідні канали мембрани нейрона. Половинне пригнічення пікової амплітуди вхідного кальцієвого струму (IC_{50}) наступало при концентрації речовини $2,3 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Залежність ефекту від концентрації блокатора відповідає біомолекулярному зв'язуванню або реакції більш високого порядку. Значних змін кінетики активації та інактивації кальцієвого струму, повністю заблокованого як атропіном, так і димедролом, не спостерігається. Як і для атропіну, блокувача дія димедролу суттєво залежить від тестуємого потенціалу.

Дію BW 755C на кальцієву провідність клітинної мембрани досліджували в діапазоні концентрацій $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л. При концентрації BW 755C $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л ефект не спостерігався. При зовнішньому застосуванні цього агента в діапазоні концентрацій $2,5 \cdot 10^{-6}$ - $2,5 \cdot 10^{-8}$ моль/л на окремих неідентифікованих нейронах (28% всіх дослідів) він підвищував величину максимальної кальцієвої провідності на 14-35%. При дії BW 755C у вказаному діапазоні концентрацій реєструвався також зсув положення максимуму вольт-амперної характеристики для кальцієвого струму у від'ємну сторону по осі потенціалу на 14 ± 6 мВ (з 9% всіх проведених дослідів).

Крім того встановлено, що BW 755C не впливає на потенціалзалежну кальцієву провідність при його внутріклітинному застосуванні в діапазоні концентрацій від $1 \cdot 10^{-7}$ до $4,75 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Ембіфін блокує кальцієвий струм менш ефективно, ніж атропін і димедрол. IC_{50} для цієї речовини складає біля 1 мМ. Залежність ефекту від концентрації відповідає мономолекулярному зв'язуванню, або реакції нижчого порядку. При дії цього агента спостерігаються деякі зміни кінетичних характеристик струмів.

Теофілін - блокатор ЦАМФ-ФДЕ, також блокує кальцієві струми ($\text{IC}_{50} > 5,0$ мМ). Кінетика реакцій цього агента відповідає мономо-

лекулярній реакції або реакції нижчого порядку.

При дослідженні препаратів альтернативної групи: клонідина, обзідана і толбутаміда, - які-небудь достовірні впливи на струми кальцію не виявлені ні при зовнішній, ні при внутріклітинній аплікаціях (речовини досліджувались в концентраціях, які знаходяться в діапазоні від $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л).

Таким чином, більшості (4 із 5) досліджених ксенобіотиків "+I/-II" типу діє властива здатність пригнічувати потенціалкеро-ванні кальцеві струми мембрани нейрона молюска. Досліджені ФАР групи "-I/+II"- неактивні на цьому об'єкті. Необхідно відзначити, що відомі активатори Са/ПФІ системи, такі як лейкотриєн C_4 , активують Ca^{2+} -канали тільки деяких нейронів, а синтетичний аналог диацилгліцерину - олеоїлацетилгліцерин переважно блокує їх.

Із викладеного вище можна зробити висновок, що для електрокеро-ваних Ca^{2+} -каналів нейронів молюска спряження з головними месенджерними каскадами не достатньо однозначне, хоча більшість речовин, які блокують Са/ПФІ і активують АдЦ-систему, проявляють властивість гальмувати кальцевий струм.

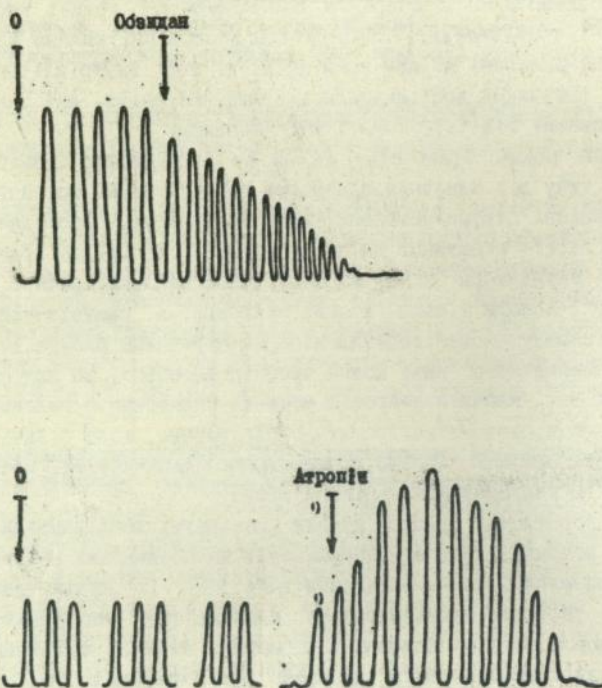
На скоротливих гладком'язевих препаратах досліджували ефекти тих же 8 речовин, що і в експериментах на поодиноких нейронах.

Встановлено, що із 5 речовин типу "+I/-II" тільки димедрол, BW 755C і теофілін мають виражену властивість гальмувати скорочення гладких м'язів сечоводів і матки. Ембіхін в максимальній досліджуваній концентрації проявляє лише тенденцію ($0,1 > p > 0,05$) до інгібуючої активності. Атропін взагалі не активний на препаратах сечоводів, а на смужках матки навіть навпаки - проявляє стимулюючий ефект (мал. 3).

Слабкі ефекти ембіхіну можна пояснити його швидкою гідролітичною інактивацією одного з двох хлорстильних радикалів, які присутні в молекулі цієї речовини.

Крім того, в силу своєї малої гідрофобності ембіхін може в недостатній мірі досягати своїх мішеней на місцях.

Відсутність дії атропіну на сечову протоку і активуючий ефект на препаратах матки можна пояснити тим, що поряд із блокадою М-холінорецепторів міоцитів, яка приводить до гальмування системи Са/ПФІ, він блокує і пресинаптичні М-холінорецептори нервових закінчень, які є в гладком'язевих препаратах. В результаті АдЦ система активується на пресинаптичному рівні.



Мал.3. Скоротлива активність гладких м'язів при дії атропіну і обшидану.

В цілому, слід все ж зазначити, що основна частина спостережених ефектів препаратів "+I/-II" типу на гладком'язевих об'єктах полягає в гальмуванні скорочення. Найбільш активною речовиною цієї групи на даних об'єктах виявився препарат BW 755C, який і був більш детально досліджений.

Пригнічення гіперкалієвих скоротливих відповідей сечової протоки спостерігалось під дією BW 755C з концентрацією $(1 \cdot 10^{-6}$ моль/л), а практично повне (95±4%) пригнічення виникало при кон-

центрації блокатора $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Цей агент не впливав на гіпонатрієву контрактуру клітин сечової протоки, що свідчить про відсутність інгібуєчої дії вказаного блокатора на механізм натрій-кальцієвого обміну. Одержані дані дозволяють допустити, що блокатор ліпоксігенази BW 755C впливає, переважним чином, на електрорегульовані кальцієві канали гладеньких м'язів.

Речовини групи "+I/-II" активували скорочення клітин гладких м'язів, але не на всіх об'єктах. Так, клонідін, активуючи скорочення сечової протоки, гальмує рухливу активність матки.

Обзидан, навпаки, активуючи скоротливість міометрія, проявляє дію пригнічення на препаратах сечової протоки (мал.3). Більш однотипними ефектами на даних об'єктах відзначається толбутамід, який надає в першому випадку достовірно стимулюючу дію, а в другому - досить чітку тенденцію до активації.

Відмінність в ефектах клонідину і обзидану на різних об'єктах можна, як і для атропіну, пояснити впливом цих речовин одночасно на пре- і постсинаптичні α_2 і β -адренорецептори відповідно. При такому поясненні стає зрозумілою і однонаправленість ефектів толбутаміду, оскільки ця речовина не має рецепторного типу дії.

В цілому, слід відзначити, що результати визначення впливу речовин двох досліджуваних груп на ЕФР лейкоцитів значно більше відповідають поділу ФАР по характеру впливу на головні месенджерні системи, ніж досліди на мембранах нейронів і скоротливих гладеньком'язевих об'єктах. Причому реєстрація ЕФР ПМЯЛ може бути достатньо інформативним методом для проведення такого аналізу.

2.3. Обчислювальний аналіз електрокінетичних характеристик ПМЯЛ.

Основними електрокінетичними характеристиками клітин є ЕФР, ζ -потенціал і густина поверхневого заряду клітини (σ).

Були розраховані ζ -потенціал і густина поверхневого заряду ПМЯЛ для інтактних клітин і на фоні дії досліджуваних ФАР.

При аналізі одержаних розрахункових даних (ζ і σ) чітко простежується картина, характерна для зміни величини ЕФР нейтрофілів під впливом речовин груп "+I/-II" і "-I/+II".

Значення ζ -потенціалу і густини поверхневого заряду нейтрофілів достовірно збільшені відносно контрольної величини при дії на клітини речовин групи "+I/-II". При дії препаратів групи "+I/-II" величини розрахованих електрокінетичних характеристик в рівній мірі знижені порівняно з контрольним значенням.

2.4. Кореляційний аналіз.

Додатково були оцінені кореляції між показниками функціональної активності клітин крові (хемокінез, хемотаксис ПМЯЛ, 6-розеткоутворююча здатність лімфоцитів миші і агрегація тромбоцитів крові шурів) і коливаннями електрокінетичних характеристик ПМЯЛ на фоні дії досліджуваних препаратів.

Використані функціональні показники клітин крові вивчалися при трьох концентраціях ФАР: $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Окремі функціональні показники під дією використаних речовин в різних концентраціях змінюються по різному. Тому кореляції із змінами ЕФР розраховували для кожної концентрації речовини окремо.

Критерієм оцінки взаємозв'язку між вивченими реакціями клітин слугила величина коефіцієнта кореляції. Одержані коефіцієнти статистично достовірні, величина їх відносно невелика і змінюється в межах від 0,2 до 0,54. Враховуючи загальноприйняті градації коефіцієнтів кореляції [Д.Сепетлів, 1968] при аналізі одержаних даних можна говорити про помірно виражений позитивний зв'язок між функціональною активністю нейтрофілів та їх електрокінетичними характеристиками. Зв'язок електрокінетичних явищ ПМЯЛ із спонтанною рухливою активністю (хемокінез) виражений сильніше ($0,37 < r < 0,54$), ніж з спрямованим рухом нейтрофілів (хемотаксис) - $0,2 < r < 0,46$. Зв'язок між електрокінетичними характеристиками ПМЯЛ і 6-розеткоутворюючою здатністю лімфоцитів виражений слабо ($r < 0,3$). А коефіцієнт кореляції між поверхневими електричними властивостями мембрани нейтрофілів і агрегацією тромбоцитів вказує на досить слабкий негативний зв'язок між цими характеристиками.

Проведені кореляційні розрахунки підтверджують основний висновок даної роботи про позитивне спряження механізму підтримання електричного потенціалу ПМЯЛ з роботою Са/ЛФІ системи і негативне - з активністю АдЦ. Оскільки аналогічний характер спряження строго доведений для хемотаксису і хемокінезу, зрозуміло, що найбільш виражені кореляційні зв'язки вдається зареєструвати при дії ФАР на один і той же тип клітин. Тому результати дослідів на Т-лімфоцитах в меншій мірі корелюють із змінами ЕФР, викликаними тими ж речовинами на ПМЯЛ. Це ж стосується виявленої тенденції до негативної кореляції даного показника з впливом речовин на агрегацію тромбоцитів.

2.5. Вплив іонізуючої радіації на електрокінетичні властивості ПМЯЛ.

2.5.1. Досліди на опроміненних щурах.

У попередніх дослідах встановлено, що найбільш інформативними строками для дослідження ЕФР нейтрофілів на фоні дії іонізуючого випромінювання є при досліджуваній моделі опромінення 1-ша і 4-та доба після дії радіації.

Було встановлено, що в процесі розвитку променевої хвороби ЕФР нейтрофілів суттєво змінюється, і ці зміни мають різнонаправлений характер.

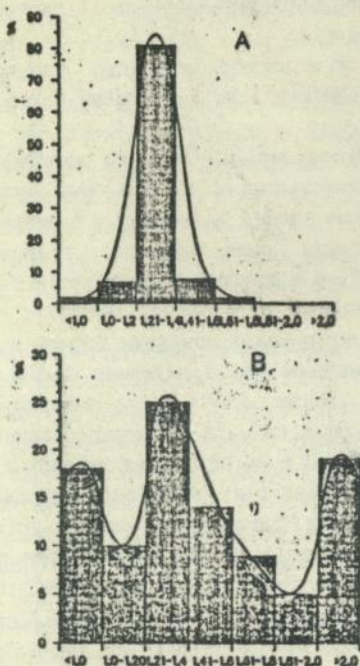
Так, через добу після дії іонізуючого випромінювання, ЕФР нейтрофілів суттєво знижується, а на 4-у добу спостерігається протилежний ефект. Таким чином, в першому із вибраних термінів спостереження дія радіації сама по собі відповідає впливу препаратів типу "+I/-II", а в другому - препаратів "-I/+II". Виявлену фазність зміни поверхневого заряду мембрани в першу добу після опромінення лейкоцитів можна пояснити прямою дією радіації на клітину. Останнє зводиться до гальмування Са/ПФІ і активації АДФ, оскільки відомо [О.І.Луїк, 1987], що в використовуваних дозах іонізуюче випромінювання гальмує клітинні реакції, які реалізуються за рахунок активації Са/ПФІ і гальмування АДФ.

Отримані експериментальні дані дають змогу зробити висновок, що зміни функцій клітинних сигнальних систем, що викликані за першу добу прямою дією радіації, є оборотними, так як через три доби в клітинах тієї ж популяції ті ж функції змінюються в зворотньому напрямку. Згідно з результатами цієї серії експериментів можна допустити, що в більш пізній термін (на 4-у добу) в опроміненому організмі з'являються фактори, які гальмують функції АДФ і активують Са/ПФІ систему, тобто, протидіють первинному ефекту іонізуючої радіації.

Були проведені дослідження по вивченню впливу деяких ліків "+I/-II" типу на ЕФР нейтрофілів опроміненних тварин. З наведених лених даних видно, що головні клітинні сигнальні системи на фоні різнонаправлених змін, викликаних опроміненням, зберігають здатність реагувати на дію лікарських речовин. Ці факти, по-перше, підтверджують, що зміни функцій клітинних сигнальних систем мають оборотний характер, і, по-друге, дають змогу зробити висновок, що на фоні опромінення може значно підвищуватись чутливість клітин до лікарських речовин. Останнє має важливе практичне значення для клінічної радіології.

2.5.2. Клінічні спостереження.

На мал. 4. наведені гістограми статистичного розподілу значень ЕФР лейкоцитів крові людини обох досліджуваних груп. Видно,



Мал. 4. Гістограми розподілу значень ЕФР. А - умовно здорові люди; Б - особи, які перебували під дією іонізуючого випромінювання; по осі абсцис - ділянки значень ЕФР; по осі ординат - частота спостереженості (%).

що у здорових людей розподіл даного показника близький до нормального закону розподілу з порівняно невеликим діапазоном розкиду значень. Середній показник ЕФР в цій групі становить $1,29 \pm 0,09$ мкм·В/см·с.

В групі осіб, які були під дією іонізуючого випромінювання, статистичний розподіл значень ЕФР має значно більш складний характер. Для оцінки діагностичної ролі методу ЕФР ПМЯЛ виходили з приведених вище гістограм. Всі обстежені в залежності від зареєстрованих значень ЕФР були розбиті на 3 групи:

- а) із значеннями ЕФР 1,2-1,4 мкм·В/см·с характерними для здорових людей;
- б) із зниженими значеннями ЕФР 0,5-1,2 мкм·В/см·с;
- в) з підвищеними значеннями ЕФР 1,4-2,7 мкм·В/см·с.

Далі по сукупності даних клінічного і лабораторного обстеження хворих теж ділили на 3 групи:

-категорія А - хворі з об'єктивними ознаками променевої патології. Величина ЕФР ПМЯЛ збільшена відносно контролю.

-категорія Б - особи, що страждають захворюваннями, які виникали після перебування в зоні і можуть бути наслідком дії іонізуючої радіації. Величина ЕФР ПМЯЛ знижена щодо контрольного значення.

-категорія В - особи, що не мають захворювань, виникнення яких могло б бути пов'язане з дією іонізуючого випромінювання. Значення ЕФР частіше відповідає нормі (1,2-1,4 мкм·В/см·с).

Необхідно відзначити, що в досліджуваній групі осіб всіх трьох категорій були відсутні онкологічні, в тому числі, онкогематологічні хворі, хворі на гострі інфекційні захворювання та інші категорії хворих, у яких ЕФР може суттєво змінюватись без залежності від зв'язку етіології захворювання з променевою дією.

Вказана обставина дає підставу вважати, що зміни мембранного потенціалу нейтрофілів у хворих категорій дійсно обумовлені дією іонізуючого випромінювання. Крім того, цим можна пояснити відсутність суттєвих відхилень значень ЕФР у більшості осіб категорії В, не дивлячись на наявність у них тих чи інших патологічних станів, не пов'язаних з впливом радіації.

Описані результати клінічних спостережень однозначно свідчать про те, що підходи до лікування таких хворих повинні визначатись диференційовано. Були складені методичні рекомендації щодо діагностичного використання методу ЕФР в клініці променевої патології, які схвалені і впроваджені в практику спеціалістами ВРиЦ АМН СРСР.

ЗАКІНЧЕННЯ

Головним результатом роботи, у відповідності з її основною метою, є вперше встановлений факт керування поверхневим зарядом мембрани за допомогою універсальних клітинних сигнальних систем: АдД та Са/ПФІ. При цьому активація Са/ПФІ і (або) гальмування АдД збільшує поверхневий негативний заряд, а при обернених співвідношеннях функцій сигнальних систем цей заряд знижується.

При дослідженнях електрокінетичних характеристик клітин крові до сьогодні було прийнято рахувати що поверхневий заряд мембрани визначається переважно хімічним складом клітинної поверхні. У відповідності з цим варто було чекати, що зміни електрокінетичних характеристик в процесі дозрівання клітини або при патології можуть відбуватись в часі, пропорційному біосинтетичним ритмам заміни мембранних компонентів. Не виключались також зміни, що залежать від ступеню експонування тих або інших заряджених груп на клітинну пверхню внаслідок конформаційних перебудов біомакромолекул.

Останнім механізмом, як правило, пояснювали наявні малочисельні спостереження змін поверхневого заряду клітини під впливом ФАР. При цьому особлива роль відводилась прямим взаємодіям ФАР з поверхневими зарядженими групами [Parrao A. e.a., 1988], ділянками зв'язування Ca^{+2} [Sowemimo-Coker e.a., 1989], або їх впливу на профіль в'язкості глікокаліксу поверхневого шару мембрани.

В нашій роботі показана достатньо однозначна залежність електричних характеристик поверхневого шару мембран від активності головних месенджерних каскадів. Широкий набір речовин, якими ми діяли на месенджерні системи, практично виключає пряму дію ФАР на поверхневі заряджені групи або інші фізико-хімічні параметри глікокаліксу. Такого чину прямі дії в використовуваних концентраціях могли давати тільки деякі досліджувані речовини, зокрема - ембіхін, як це обговорювалося у відповідному розділі роботи. Всі інші досліджувані речовини, що проявляють подібний вплив на ЕФР, різко відрізняються один від одного як хімічно, так і за механізмами дії і практично не можуть однотипно взаємодіяти безпосередньо з біополімерами зовнішньої поверхні мембрани. Досліджувані ФАР були об'єднані тільки у відповідності із стереотипами їх фармакологічної дії на клітинні сигнальні системи: "+I/-II" або "-I/+II" в прийнятих нами умовних позначеннях.

Отримані нами дані дозволяють вважати, що величина поверхневого заряду мембрани визначється динамічною роботою клітинних сигнальних каскадів. Це свідчить про те що поверхневий заряд мембрани, вірніше його зміни, є одним із елементів функції сигнальних систем клітини. Раніше про це не існувало яких-небудь уявлень. Таким чином, зміни поверхневого потенціалу мембрани також є одєю із найбільш важливих подій в сигнальній трансдукції. І ці зміни залежать не стільки від трансмембранного переносу іонів, а й визначаються, головним чином, конформацією експонованих назовні клітини біополімерів, що несуть заряджені групи, а також іншими фізико-хімічними властивостями глікокаліксу. Виявлені достатньо високі кореляції електрокінетичних властивостей ПМЯЛ з іншими функціями цих клітин (хемотаксис, хемокінез, фагоцитоз, дегрануляція, викид лейкотриєнів та інших біорегуляторів), що ініціюються за рахунок гальмування АДЦ і активації Са/ПФІ (В.П. Кухар, О.І.Луїк., 1991). Виходячи з цього можна зробити висновок, що динамічні зміни електрокінетичних властивостей лейкоцитів є не засобом реалізації якої-небудь функції, а компонентом роботи систем трансмембранної сигналізації. Встановлена в дослідях з КТ залежність електрокінетичних властивостей ПМЯЛ від стану G-білків підтверджує висновки про безпосередній зв'язок поверхневого заряду клітини з функціями її сигнальних систем.

Поряд з поглибленням уявлень про механізми сигнальної трансдукції, отримані дані є ще одним вагомим підтвердженням концепції біорегуляторної стереотипії. Одним із висновків, що впливає з даної концепції, є доцільність проведення первинного скринінгу нових ФАР на клітинних модельних системах, у яких характеристики, що оцінюються, найбільш однозначно пов'язані з роботою головних сигнальних каскадів. І оцінка ЕФР ПМЯЛ є однією із найбільш придатних моделей для первинного скринінгу.

В дослідях з кро'ю людей, які були під дією іонізуючого випромінювання, показано, що даний показник є також дуже важливим в діагностичному відношенні.

Висновки:

1. Встановлено, що електрокінетичні властивості ПМЯЛ крові щурів контролюються активністю систем клітинної сигналізації: АДЦ і Са/ПФІ. Згідно з отриманими даними речовини "+I/-II" категорії зменшують ЕФР, а отже і негативний поверхневий потенціал мембрани нейтрофілів, а речовини "-I/+II" категорії підвищують величину

електрокінетичних характеристик. Таким чином, отримані результати показали, що генерація заряду мембрани ПМЯЛ здійснюється за рахунок активації Са/ПФІ і гальмування АдЦ-системи.

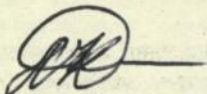
2. Показано, що механізм підтримання негативного поверхневого заряду мембрани ПМЯЛ контролюється КТ-чутливими G-білками, незалежно від поступаючих на них зовнішніх сигналів. Це підтверджує висновок про безпосередній зв'язок негативного поверхневого заряду мембрани нейтрофілів з функціонуванням клітинних сигнальних каскадів і підтримується шляхом активації Са/ПФІ системи та пригнічення АдЦ-месенджерного каскаду.

3. Характер впливу речовин двох фармакологічних груп на біомоделі підтверджує справедливість використаного в даній роботі нового підходу до класифікації ФАР і дає змогу вважати, що оцінка ЕФР ПМЯЛ є адекватним і інформативним методом скринінгу нових ФАР.

4. Зміни ЕФР ПМЯЛ на фоні дії іонізуючої радіації, а також зміна чутливості клітини до фармакологічних речовин в цих умовах обґрунтовує необхідність диференційованого підходу до лікарської терапії урвень іонізуючим випромінюванням. Це дозволяє використовувати показник ЕФР як діагностичний тест, який впроваджений в практику спеціалістами ВРНЦ АМН СРСР.

5. Результати проведеного кореляційного аналізу між показниками функціональної активності клітин крові і коливаннями ЕФР нейтрофілів на фоні дії досліджуваних препаратів підтверджують висновок про те, що негативний поверхневий потенціал мембрани ПМЯЛ підтримується шляхом активації Са/ПФІ та пригнічення АдЦ-систем сигнальної трансдукції. Максимальний коефіцієнт кореляції встановлений між ЕФР і показниками активної рухливості ПМЯЛ.

Посишуквач



Капашнікова Л. В.

Основні матеріали дисертації викладені в публікаціях.

1. Скрыма Р.Н., Луйк А.И., Калашникова Л.Е. и др. Влияние блокатора липооксигеназы BW 755C на функционирование структур обеспечения Са-зависимые процессы // Нейрофизиология. - 1987. - т.19. - №6. - с. 841 - 845.
2. Калашникова Л.Е., Дегтярь В.Е., Скрыма Р.Н. Механизм действия различных высокотоксичных веществ в пределах фосфоинозитидной системы вторичных мессенджеров //Сб.: "Биохимия - медицине", Ленинград, "Медицина". - 1988.- с. 92-93.
3. Kalashnikova L.E., Degtyar V.E., Skryma R.N., Luik A.I. Regulation of nerve cell Ca-channels by the intermediate products of phosphoinositides exchange //Abstracts of 4th International Congress of cell biology. Canada, Montreal. - 1988. - p.264.
4. Скрыма Р.Н., Луйк А.И., Калашникова Л.Е. и др. Особенности влияния лейкотриена C₄ и блокатора его биосинтеза BW 755C на сократительную способность гладких мышц и функционирование потенциалозависимых кальциевых каналов нервной клетки //Нейрофизиология, 1989. - т.21. - №2. - с. 262-264.
5. Скрыма Р.Н., Кухарь В.П., Калашникова Л.Е. и др. Действие лейкотриена LTC₄ на кальциевые каналы соматической мембраны нервной клетки и тонус гладкомышечных органов //Нейрофизиология, 1989. - т.21. - №2. с.24 - 31.
6. Дегтярь В.Е., Скрыма Р.Н., Калашникова Л.Е. Нейрофизиологическое изучение клеточных механизмов регуляции полифосфоинозитидной системы вторичных мессенджеров олеоилацетилглицеролом, лейкотриенами и их ингибиторами // "Актуальные вопросы клеточной биологии: факторы роста, дифференцировки, злокачественной трансформации", Ленинград, "Наука". - 1989. - с. 87.
7. Метелица Л.А., Калашникова Л.Е., Могилевич С.Е., Луйк А.И. Использование показателей Е-розеткообразующей способности и электрофоретической подвижности для комплексной оценки функционального состояния лейкоцитов // Клиническая лабораторная диагностика (на депоненте). - 1993.
8. Калашникова Л.Е., Метелица Л.А. Использование моделей клеточной активности для первичного скрининга физиологически активных веществ // Республ. межвед. сб. научн. тр. физиологически активные вещества (в печати).
9. Калашникова Л.Е., Метелица Л.О. Лейкоцити, як модель для первинного серинінгу фізіологічно активних речовин // Фармацевтичний журнал (у друці).

462459

AB 29.724
AB 29.724
AB 29.724

AB 29.724

Підл. до друку. 25.04 84 Формат 60 × 84^{1/8} Папір офс
Друк. офс. Умовн. друк. арк. 1,16 Обл.-вид. арк. 0,87 тир. 100.
Зам. 4-2311.

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Репіна, 4.