

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І
РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р. Є. КАВЕЦЬКОГО

На правах рукопису

БЛЮМ ІРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

**Механізми модифікуючої дії
пептидогліканів на радіаційне
ураження лімфоцитів**

03.00.01. - радіобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

*дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук*

КИЇВ - 1994

AB 30.03

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії
Київського університету ім. Тараса Шевченка

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
професор Цудзевич Б. О.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук,
Савцова З.Д.

кандидат біологічних наук,
Лукашова Р.Г.

Провідна установа: Український державний медичний
університет ім. академіка
О. О. Богомольця, Київ

Захист відбудеться "26" травня 1994 р.
о ~~14⁰⁰~~ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.38.02.
в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України (252022,

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці ІЄПОР НАН
України, Київ 22, вул. Васильківська, 45

Автореферат розісланий "25" квітня 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради, *J. Mas* Г.Й.Лауренчук
канд. біол. наук



ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Незважаючи на велику кількість фактичного матеріалу, радіобіологічна наука ще не отримала однозначну відповідь на питання про ведучі механізми уражаючої дії радіації на окремі типи клітин і тим більше на багатоклітинний організм як єдине ціле. Відомо, що одним із важливих факторів, які визначають закономірності радіаційного ураження організму є радіочутливість тканин, органів та систем, важливих для виживання організму [Бонд та ін., 1971; Кудряшов і Беренфельд, 1982; Ярмоненко, 1984]. За морфологічними змінами найбільш радіочутливими є органи кровотворення. Ураження кісткового мозку, тимусу, селезінки, лімфатичних вузлів є одним із важливих проявів гострого променевого захворювання [Петров і Зарецька, 1970].

Значні морфологічні та функціональні порушення спостерігаються у всіх органах кровотворення, що, в свою чергу, призводить до порушень імунних функцій організму. При опроміненні пригнічення імунітету в організмі являє собою складний багатоступінчастий процес. Виходячи з цього, цілком обґрунтованими видаються схеми радіаційної профілактики та терапії, які базуються на хімічній корекції окремих ланцюгів імунної системи [Гуськова і Байсоголов, 1970; Ільїн та ін., 1975; Суворов і Шашков, 1975]. Роботи у цьому напрямку в ряді випадків пов'язані з пошуком нових ефективних захисних та корегуючих засобів, здатних цілеспрямовано впливати на функції імунокомпетентних клітин.

Серед речовин, які потенційно здатні проявляти модифікуючу дію у відношенні до тих чи інших типів клітин імунної системи, особливу увагу привертають імуномодулюючі компоненти природного походження - бактеріальні ліпополісахариди (ЛПС) та пептидоглікани (ПГ). Було встановлено, що ЛПС мають виражену протиопромінювальну дію [Misustova et al., 1984; Richardson & Elving, 1987]. Аналогічні властивості ПГ майже не вивчалися, хоча вони проявляють мітогенну та поліклональну дію на лімфоцити [Вершигора і Позур, 1986], що і дає підставу передбачати наявність таких властивостей. Однак вивчення шляхів реалізації протиопромінювальної дії природних імуномодуляторів зустрічає труднощі у зв'язку з тим, що відсутня інформація про первинні механізми ініціювання імуномодулюючої активності цих речовин.

Здатність екзогенних імуномодуляторів індукувати імунну відпо-

відь визначається їх фізико-хімічними властивостями, які дають можливість активувати імунокомпетовані клітини, що і проявляється у стимулюванні проліферації В- і Т-лімфоцитів [Morrison & Ulevich, 1978]. Критичним етапом активації клітин імунної системи ЛПС і ПГ є їх дія на плазматичні мембрани. ПГ і ЛПС специфічно зв'язуються з одним і тим же білком на поверхні В-лімфоцитів [Dziarski, 1991]. Ряд досліджень демонструє принципову роль циклічних нуклеотидів [Vazgerz et al., 1991] та іонів Ca^{2+} [Trotter & Quitana, 1981] як внутрішньоклітинних посередників сигналів, що індукують імунні відповіді.

Показано, що ЛПС індукуює накопичення інозитольних фосфатів у моноцитах, тромбоцитах і лімфоцитах крові [Вікторов та ін., 1988; Kozak et al., 1989]. Як наслідок, ЛПС промотують транслокацію протеїнкінази С із розчинної в нерозчинну фракцію В-лімфоцитів та активують її [Bosca & Diaz-Guerra, 1988], що і призводить до проліферації клітин даного типу [Xu et al., 1990]. Все ж механізм дії ПГ на імунокомпетовані клітини поки-що не встановлений. Відомо лише, що мурамідипептид, синтетичний аналог ПГ, може індукувати обмін фосфоінозитидів у лімфоцитах [Kozak et al., 1989]. Тому випробування ПГ на наявність у них модифікуючих дію опромінення властивостей, так як і вивчення біохімічних механізмів реалізації їх дії на Т- і В-лімфоцити у нормі та при опроміненні, становить суттєвий інтерес. Це дає підставу сформулювати основну мету і задачі досліджень.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було з'ясування механізмів протиопромінювальної дії пептидогліканів на основі аналізу взаємозв'язків між особливостями їх структури та імуномодулюючою активністю.

У конкретні задачі роботи входило:

1. Для вивчення модифікуючої дії та особливостей складу одержати ПГ із клітинних стінок *Staphylococcus aureus* і *Brevibacterium flavum*.
2. Оцінити вплив ПГ на особливості імуномодулюючої активності, поліклональних властивостей та активацію макрофагів.
3. Вивчити закономірності впливу ПГ різного складу на інтенсивність синтезу ДНК *in vivo* у кістковому мозку, тимусі та селезінці мишей.
4. З'ясувати відмінності мітогенних відповідей на клітинах тимусу та селезінки у опромінених мишей та при дії ПГ.
5. Вивчити особливості впливу опромінення і ПГ на транслокацію про-

теїнкінази С у спленоцитах мишей.

6. Дослідити рівні циклічних нуклеотидів в селезінці опромінених мишей та на фоні використання ПГ.
7. Визначити вплив ПГ на фрагментацію ДНК спленоцитів у нормі та при опроміненні.

Наукова новизна роботи. Вперше одержаний ПГ із *Br. flavum* і вперше продемонстрована наявність модифікуючих властивостей у ПГ із *S. aureus* і *Br. flavum* за променевого ураження. Показано, що в основі вказаних властивостей ПГ лежить їх здатність ефективно впливати на різні ланки імунної системи мишей. Визначені закономірності впливу ПГ на інтенсивність синтезу ДНК *in vivo* у кістковому мозку, тимусі та селезінці мишей. Вперше встановлено, що реалізація протиопромінювальної дії ПГ здійснюється за участю цАМФ-залежної системи фосфорилування та протеїнкінази С. Вперше показано взаємозв'язок між особливостями структури ПГ і особливостями впливу цих полімерів на ефекторні системи імунокомпетованих клітин.

Запропоновано можливий механізм реалізації модифікуючої дії ПГ шляхом специфічної регуляції функціональної активності різних типів клітин імунної системи за участю систем вторинних посередників і регуляції в такий спосіб активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази.

Теоретичне і практичне значення роботи. Продемонстрована перспективність використання ПГ бактерій як засобів, що модифікують дію опромінення. Розроблені способи посилення та пролонгування протиопромінювального ефекту ПГ шляхом їх комбінованого використання із відомим радіопротектором - серотоніном. Отримані дані сприяють більш глибокому розумінню механізмів регуляції функціональної активності лімфоцитів за участю ПГ в інтактному організмі та при дії опромінення, що дає практичний внесок у розробку стратегії підвищення радіорезистентності клітин за допомогою хімічних засобів.

Запропонований підхід до використання *Br. flavum* як джерела ПГ, що може знайти широке практичне застосування. Це може бути покладене в основу промислових способів одержання ПГ в умовах розширення їх використання в якості мітогенів, імуноад'ювантів і т.д.

Апробація роботи. Матеріали дисертації були представлені і повідомлені на X Всесоюзному симпозіумі "Структура та функції клітинного ядра" (Гродно, 1990), на I з'їзді імунологів Білорусі (Мінськ, 1990).

Публікації. По темі дисертації опубліковано 6 робіт.

Об'єм і структура дисертації. Дисертаційна робота складається

з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів роботи та їх обговорення, заключення, висновків, списку літератури, що складається з 189 робіт. Дисертація викладена на 133 сторінках, має у своєму складі 22 рисунки, 13 таблиць.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В дослідах використовували безпорідних білих мишей-самців ма-сою 20 - 22 г, мишей лінії СВА, С57BL та гібридів (СВАхС57BL) F₁. Тварин опромінювали на установці РУМ-17 в дозі 0,236 Кл/кг за умов: фільтри - 0,3 мм Сu, 0,1 мм Al, напруга 190 кВ, сила струму 15 мА, потужність дози у повітрі 2x10⁴ А/кг, відстань до поверхні шкіри тварин 50 см.

У роботі для отримання ПГ використовували культуру *S. aureus* (штамм 3272) і *Br. flavum* (штам sp22). ПГ одержували за методом Рашба (1976). Токсичність полімерів оцінювали за методом Біленького (1963). Радіопротекторні властивості речовин визначали за методом стимуляції ендогенного утворення колоній у селезінці [Чертков і Гуревич, 1984]. Для оцінки протиопромінювальної дії ПГ (1000 мкг/тварину) і серотоніну (15 мг/кг) використовували мишей лінії СВА, котрих опромінювали за вищеназваних умов. Пептидоглікани у цій серії досліджень вводили в дозі 1000 мкг/тварину за 24 год до опромінення, серотонін - за 15 хв до опромінення. Величину протиопромінювального ефекту визначали за виживанням тварин на протязі 30 днів після опромінення.

Імунологічну реактивність тестували за методом [Jerne et al., 1963]. Вплив ПГ із *S. aureus* і *Br. flavum* на бактерицидну активність макрофагів вивчали за допомогою НСТ-тесту [Грачева, 1984]. Для вивчення впливу ПГ на інтенсивність синтезу ДНК in vivo їх вводили внутрішньоочередино в дозах 100 і 10000 мкг/тварину. Дослідження мітогенної дії здійснювали за допомогою реакції бласттрансформації.

Активність протеїнкінази С досліджували за методом Кіккави [Kikkava et al., 1986]. Фрагментацію ДНК вивчали за методом Газієва [Газієв, 1976]. Вивчення вмісту циклічних нуклеотидів проводили на рідинно-сцинтиляційному лічильнику SL-4000 "Intertechique". Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами ва-ріаційної статистики [Кокунін, 1975].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Хоча структура стафілококового ПГ досить добре вивчена, при роботі з новим штамом бактерій необхідна ідентифікація його амінокислотного складу. Це зумовлено значною внутрішньовидовою варіабільністю містків, що зшивають цукропептидні одиниці [Вершигора і Позур, 1986]. В результаті наших досліджень було встановлено, що одержаний нами ПГ із стафілококу містив аланін, глютамінову кислоту, гліцин, лізин і серин, а із аміновуглеводнів - N-ацетилглюкозамін та N-ацетилмурамову-кислоту в еквімолярних кількостях. У кислотному гідролізаті були виявлені два аміновуглеводні - N-ацетилглюкозамін та N-ацетилмурамова кислота, - а також діамінопімелінова

Таблиця 1

Протиопромінювальна активність комбінації пептидогліканів із серотоніном при опроміненні мишей лінії СВА

Умови введення радіопротекторів	Кіль-ть тварин	Середня тривалість життя тварин	Вживання, %
Контроль	20	7,4	0
Серотонін, водний розчин (за 15 хв до опромінення)	20	10,7	28
ПГ із <i>S. aureus</i> (1000 мкг/мишу за 24 год до опромін.) + серотонін (за 15 хв до опромінення)	15	12,6	60
ПГ із <i>Br. flavum</i> (1000 мкг/мишу за 24 год до опромін.) + серотонін (за 15 хв до опромінення)	15	12,7	73,3

кислота.

Раніше була продемонстрована здатність ПГ стимулювати утворення КОУ у кістковому мозку і селезінці мишей при опроміненні в сублетальних дозах [Позур, 1983]. У наших дослідках спостерігалась колонієстимулююча дія як ПГ із *S. aureus* так і у ПГ із *Br. flavus*. Більш виражений стимулюючий ефект спостерігався у разі використання ПГ із *Br. flavus* у дозі 1000 мкг/тварину ($40,6 \pm 2,1$) у порівнянні з ПГ із *S. aureus* у тій же дозі ($35,3 \pm 2,3$) ($p < 0,05$).

Отримані дані по вивченню протиопромінювальних властивостей ПГ демонструють, що введення їх за 24 год до опромінення дає ефект більший у два рази в порівнянні із введенням за 15 хв до опромінення. Крім того, комбіноване використання серотоніну і ПГ збільшують протиопромінювальну дію останніх.

Враховуючи, що ПГ притаманні мітогенні властивості і як наслідок вони можуть стимулювати синтез ДНК у різних тканинах, ми дослі-

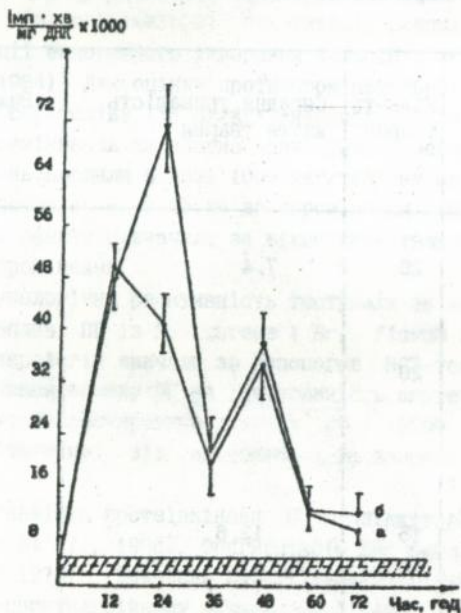


Рис. 1. Зміна інтенсивності синтезу ДНК у селезінці мишей після введення ПГ із *Br. flavus* у дозах 100 мкг (крива а) і 1000 мкг (крива б) на тварину

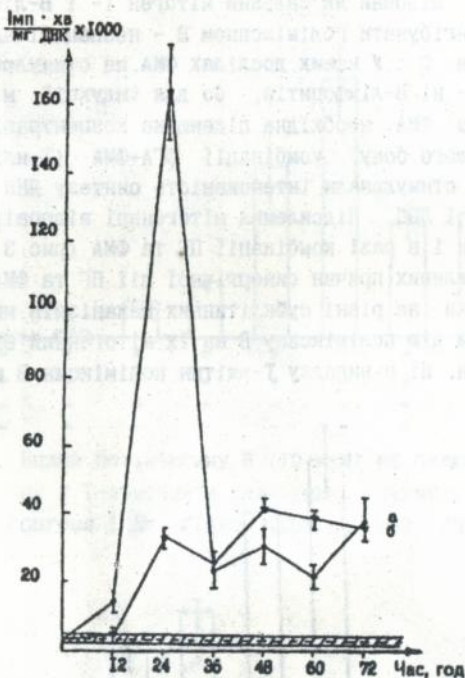


Рис. 2. Зміна інтенсивності синтезу ДНК у селезінці мишей після введення ПГ із *S. aureus* у дозах 100 мкг (крива а) і 1000 мкг (крива б) на тварину

дили їх вплив на синтез ДНК *in vivo*. Із рисунків 1 та 2 видно, що ПГ можуть стимулювати інтенсивність синтезу ДНК *in vivo* у селезінці мишей. Тому далі нам було цікаво дослідити здатність ПГ проявляти мітогенну дію на культурах клітин селезінки і тимусу інтактних та опромінених мишей. При концентрації 200 мкг/мл індекс стимулювання для ПГ із *S. aureus* дорівнює 22,8 а для ПГ із *Br. flavus* 17,8. Різницю у стимулюванні, можливо, можна пояснити різною структурою стовбурних пептидів.

Наступні експерименти для уточнення їх мітогенної дії на лімфоцити були проведені на ізольованих В- і Т-клітинах селезінки. Показано, що культури В- і Т-клітин відповідали збільшенням інтенсивності синтезу ДНК на дію ЛПС і ФГА.

Для потенціювання дії цих мітогенів ми використали форболми-

ристатацетат (ФМА), відомий як сильний мітоген Т- і В-лімфоцитів, ефекти якого можна інгібувати поліміксином В - неспецифічним інгібітором протеїнкінази С. У наших дослідах ФМА не стимулював мітогенну відповідь ні Т- ні В-лімфоцитів, бо для індукції мітогенної відповіді лімфоцитів ФМА необхідна підвищена концентрація Ca^{2+} у клітині. Але ж з іншого боку, комбінації ФГА+ФМА (Т-клітини) і ЛПС+ФМА (В-клітини) стимулювали інтенсивність синтезу ДНК значніше ніж окремо взяті ФГА і ЛПС. Підсилення мітогенної відповіді лімфоцитів ми спостерігали і в разі комбінації ПГ та ФМА (рис.3 і рис.4)

Для вивчення можливих причин синергічної дії ПГ та ФМА на В- і Т-лімфоцити селезінки на рівні субклітинних механізмів ми провели досліди, які вивчали дію поліміксину В на їх мітогенний ефект. Але ні в випадку В-клітин, ні в випадку Т-клітин поліміксин В не знімав

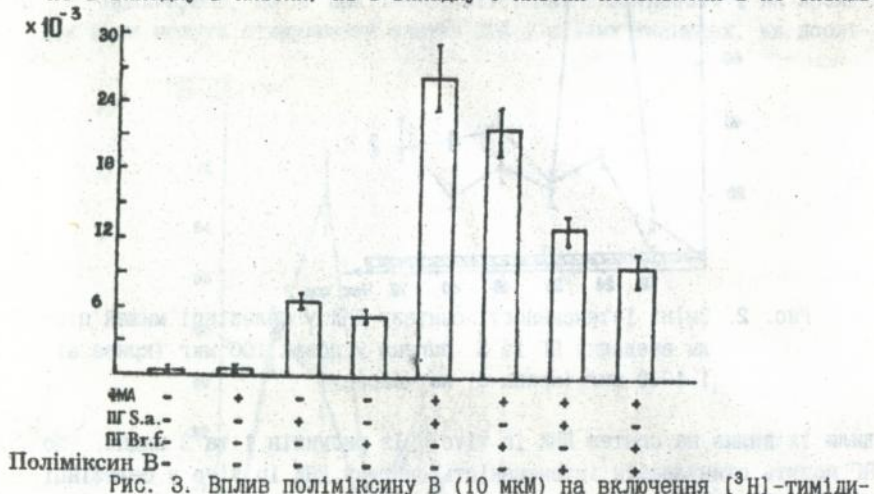


Рис. 3. Вплив поліміксину В (10 мкМ) на включення [³H]-тимідину у В-лімфоцити селезінки, стимульованих ПГ із *S. aureus* і *Br. flavum* (200 мкг/мл) і і/чи 10 нг/мл ФМА

повністю синергічних ефектів ФМА і досліджуваних ПГ. Отримані результати вказують на деякі спільні механізми реалізації мітогенної дії ПГ і ЛПС за участю протеїнкінази С.

Приймаючи до уваги результати, що отримані при вивченні особливостей впливу ПГ на інтенсивність синтезу *in vivo* і *in vitro*, а також особливостей прояву модифікуючих властивостей, ми вважали за необхідне дослідити ці особливості при дії опромінення. Виявилось;

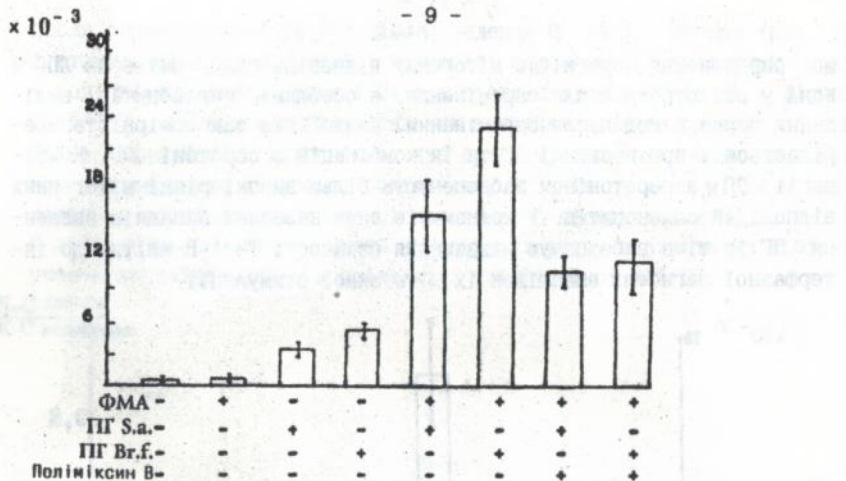


Рис. 4. Вплив поліміксину В (10 мкМ) на включення [³H]-тимідину у Т-лімфоцити селезінки, стимульованих ПГ із *S. aureus* і *Br. flavum* (200 мкг/мл) і/чи 10 нг/мл ФМА.

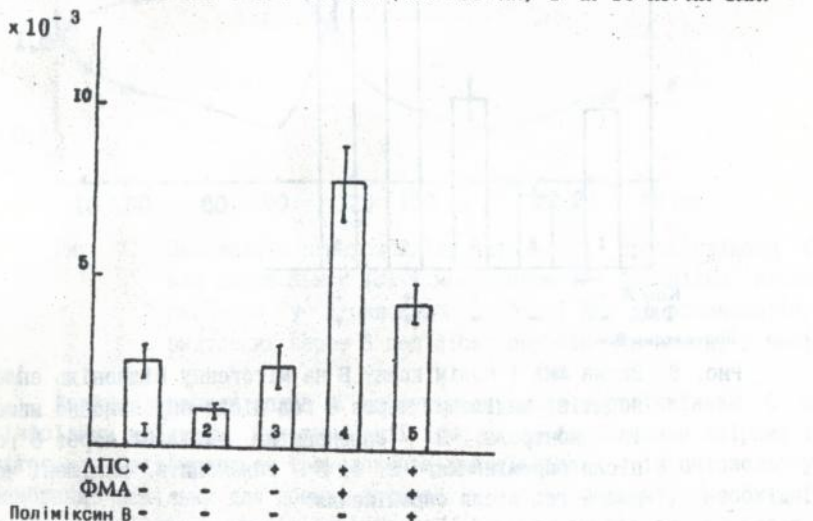


Рис. 5. Вплив ФМА і поліміксину В на мітогенну відповідь спленоцитів, виділених через 6 год після опромінення мишей: 1 - контроль; 2 - спленоцити, виділені через 6 год після опромінення; 3, 4, 5 - спленоцити, виділені через 6 год після опромінення.

що опромінення пригнічує мітогенну відповідь спленоцитів на ЛПС і Кона у всі строки після опромінення, а особливо, спленоцитів, виділених через 6 год після опромінення. Аналогічна закономірність зберігається і при введенні ПГ та їх комбінацій з серотоніном. Комбінації ПГ з серотоніном забезпечують більш високі рівні мітогенних відповідей спленоцитів. У кожному із вище названих випадків введення ПГ *in vivo* забезпечує підвищення стійкості Т- і В-клітин до інтрафазної загибелі внаслідок їх мітогенної стимуляції.

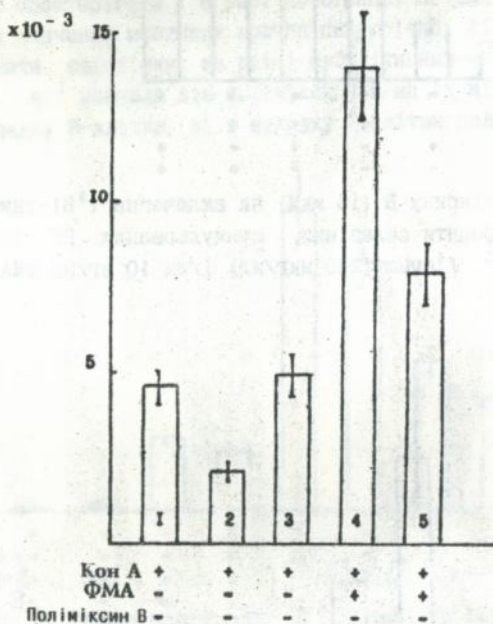


Рис. 6. Вплив ФМА і поліміксину В на мітогенну відповідь спленоцитів, виділених через 6 год після опромінення мишей: 1 - контроль; 2 - спленоцити, виділені через 6 год після опромінення; 3, 4, 5 - спленоцити, виділені через 6 год після опромінення.

Враховуючі дані, що наведенвище, ми дослідили можливу роль протеїнкінази С в опосередкуванні протиопромінювальної дії ПГ на спленоцити. Нами вивчався вплив ФМА і поліміксину В на стимуляцію ЛПС мітогенної відповіді спленоцитів, що виділялись через 6 год

після опромінення і 24 год після введення ПГ із *S. aureus* (рис. 5) і стимуляцію Кона мітогенної відповіді спленоцитів, виділених через 6 год після опромінення і 24 год після введення ПГ із *Br. flavus* (рис. 6). В обох експериментальних випадках можлива синергічна дія ФМА з ЛПС і Кона, відповідно, яка пригнічується одночасним внесенням у середовище інкубації поліміксину В, ніж це мало місце в аналогічних дослідах при вивченні мітогенного ефекту даних ПГ на Т- і В-лімфоцити селезінки мишей. Ці результати вказують на побічну участь протеїнкінази С в реалізації модифікуючої дії ПГ.

ПК-С дослід
ІК-С контроль

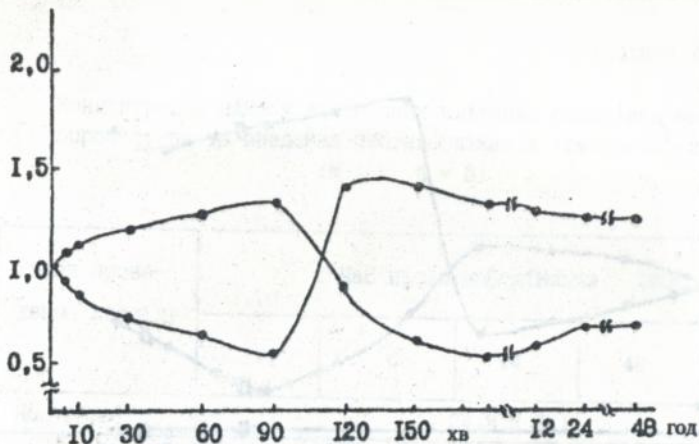


Рис. 7. Залежність перерозподілу активності протеїнкінази С між цитозольною (○) і мембранною (◊) фракціями після внесення у середовище інкубації ЛПС до спленоцитів, виділених через 6 год після опромінення мишей, у часі.

Далі ми вивчали вплив ПГ на функціонування протеїнкінази С в лімфоїдних клітинах. При активації лімфоцитів форболовими ефірами і мітогенами відбувається транслокація протеїнкінази С із цитозолу у мембрани. Оскільки для повної активації цього ферменту необхідні фосфоліпіди, така транслокація може являтися механізмом, що забезпечує екзогенну активацію протеїнкінази С. При вивченні перерозподілу активності протеїнкінази С між цитозолем і мембранною фракцією спленоцитів, стимульованих до мітогенної відповіді ПГ, нами було

відмічено збільшення активності протеїнкінази С у цитозолі через 30 хв після внесення кожного із них у середовище інкубації. Через 150 хв спостерігалось збільшення активності протеїнкінази С у мембранній фракції.

Нами також вивчались закономірності перерозподілу активності протеїнкінази С між цитозольною і мембранною фракціями спленоцитів мишей, виділених через 6 год після опромінення і стимуляції ЛПС (рис. 7) та впливу ПГ із *S. aureus* у часі (рис. 8). Як свідчать на-

ПК-С досвід
ПК-С контроль

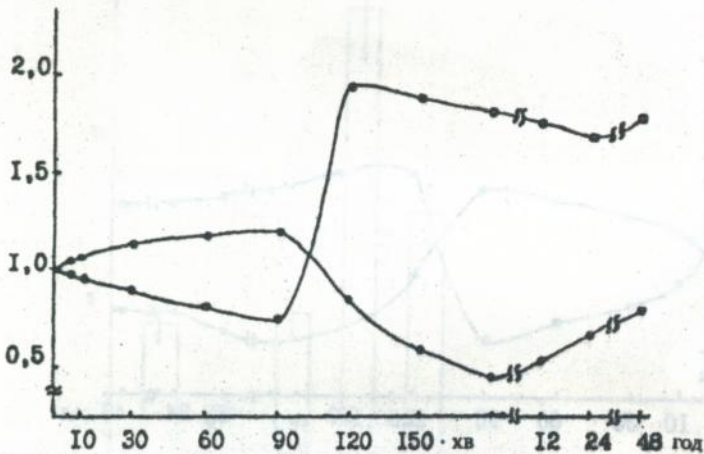


Рис. 8. Залежність перерозподілу активності протеїнкінази С між цитозольною (○) і мембранною (●) фракціями після внесення у середовище інкубації ЛПС до спленоцитів, виділених через 6 год після опромінення мишей, в умовах модифікуючої дії ПГ із *S. aureus* у часі.

ведені дані, опромінення не змінює загального характеру залежності перерозподілу активності протеїнкінази С між двома фракціями у часі. Використання ПГ із *S. aureus* забезпечує два ефекти на транслокацію ферменту. По-перше, у всі строки дослідіу із спленоцитами, отриманими через 6 год після опромінення, використання ПГ дозволяє одержати більш високий рівень активності протеїнкінази С в обох фракціях в порівнянні з дослідіами, проведеними на опроміненіх тва-

ринах. По-друге, використання ПГ із *S. aureus* забезпечує більш високий рівень транслокації протеїнкінази С у мембранну фракцію.

Встановлено, що активація протеїнкінази С призводить до модуляції аденілатциклазної системи В-лімфоцитів, зміні вмісту циклічних нуклеотидів у лімфоїдних клітинах. При цьому відомо, що апоптична загибель лімфоцитів може викликатись глюкокортикоїдами або агентами, що підвищують рівень внутрішньоклітинного цАМФ і, відповідно, цАМФ-залежної протеїнкіназної активності. Тому нами були вивчені зміни вмісту цАМФ у клітинах селезінки мишей і вплив опромінення на цей процес (табл. 2). Встановлено, що обидва ПГ стимулю-

Таблиця 2

Концентрація цАМФ у лімфоїдних клітинах селезінки мишей після опромінення та введення пептидогліканів (гмоль/10⁷ клітин).

(M ± m, n = 3)

Умови проведення досліджу	Час після опромінення (900 р), год				
	1	6	24	48	72
Контроль	24,8 ± 3,1				
Опромінення ПГ <i>S. aureus</i> (1000 мкг за 24 год до опромінення)	24,8 ± 3,4	20,3 ± 2,9	10,6 ± 1,2*	13,8 ± 1,8*	5,6 ± 1,1*
ПГ <i>Br. flavum</i> (1000 мкг за 24 год до опромінення)	26,4 ± 1,9	37,9 ± 3,6*	35,1 ± 5,2*	23,4 ± 4,1	22,7 ± 2,7
	27,1 ± 2,8	33,4 ± 3,9*	34,7 ± 4,8*	26,8 ± 3,8	1,3 ± 0,4*

P < 0,05

ють накопичення цАМФ в клітинах селезінки максимально через 24 і 48 год після введення. При використанні ПГ концентрації цАМФ у клітинах селезінки перевищують величини, отримані при опроміненні тварин без використання ПГ. Таким чином, при стимуляції синтезу ДНК ПГ

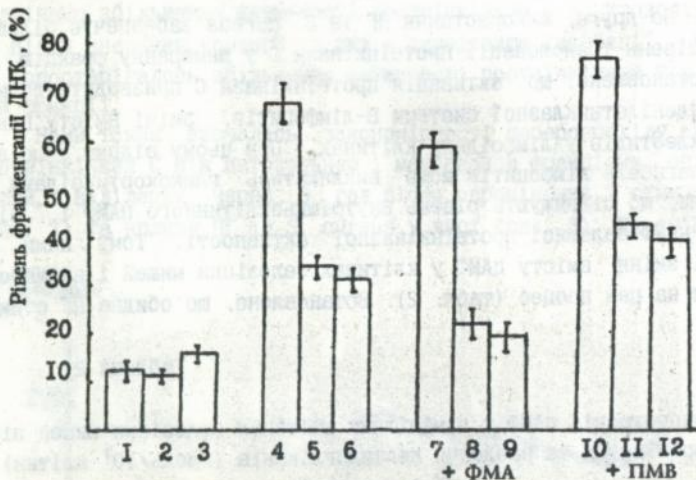


Рис. 9. Вплив ПГ на рівні фрагментації ДНК спленоцитів мишей: 1 - контроль; 2 - контроль після інкубації з ФМА; 3 - контроль з поліміксини В; 4, 7, 10 - клітини, виділені через 6 год після опромінення; 5, 8, 11 - клітини, виділені через 6 год після опромінення з попереднім введенням ПГ із *S. aureus*; 6, 9, 12 - клітини, виділені через 6 год після опромінення з попереднім введенням ПГ із *Br. flavum*;

відмічене підвищення рівнів ЦАМФ може відігравати важливу роль, а також приймати участь у опосередкуванні модифікуючої дії ПГ, що вивчалися.

Враховуючи модифікуючі властивості ПГ і механізми опосередкування їх дії на лімфоцити, ми вивчили їх здатність впливати на фрагментацію ДНК у спленоцитах мишей (рис. 9). Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежна ендонуклеаза - фермент, що опосередковує радіаційну загибель лімфоцитів - регулюється при участі системи вторинних посередників. Отримані результати свідчать про те, що рівень фрагментації ДНК у контролі становить 11%. Внесення ФМА достовірно не змінює цей показник, поліміксин В значно збільшує його.

Спленоцити, виділені через 6 год після опромінення мишей, характеризуються 66%-ним рівнем фрагментації ДНК. При введенні ПГ за 24 год до опромінення рівень фрагментації ДНК знижується у два рази. Це може пояснюватись активацією протеїнкінази С і пов'язані з

цим процесом змінами концентрації цАМФ, що логічно співпадає з отриманими результатами у нашій роботі.

Внесення у середовище інкубації ФМА знижує рівень фрагментації ДНК на 57%. Звідси випливає, що протеїнкінази С може належати тригерна роль у регуляції ендонуклеазної активності. Ще більший ефект на зменшення фрагментації ДНК проявляється після його внесення у середовище інкубації спленоцитів, виділених через 6 год після опромінення в умовах використання ПГ. Поліміксин В вірогідно збільшує рівень фрагментації ДНК в спленоцитах опромінених тварин, а також спленоцитах опромінених тварин і введення досліджуваних ПГ.

Таким чином, отримані результати наглядно демонструють той факт, що протеїнкіназа С відіграє суттєву роль в опосередкованні модифікуючої дії ПГ на спленоцити, у тому числі через регуляцію Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази. Це не виключає того, що пострадіаційна загибель лімфоцитів може регулюватися за допомогою і інших сигнальних систем, у тому числі і цАМФ. Очевидно ці шляхи також можуть бути задіяні в реалізації модифікуючих ефектів ПГ на дію опромінення.

ВИСНОВКИ

1. Встановлені модифікуючі дію опромінення властивості виділених і вперше охарактеризованих за хімічним складом пептидоглікани із клітинних стінок *S. aureus* і *Br. flavum*. При цьому показано залежність модифікуючої дії від структурних відмінностей пептидних компонентів ПГ.

2. Особливості імуномодулюючої активності і здатність активувати макрофаги перитонеального ексудату мишей залежать від різниці в структурі ПГ.

3. Активація пептидогліканами синтезу ДНК в імунокомпетованих тканинах є важливою ланкою в реалізації їх модифікуючих властивостей. Максимальний вплив на інтенсивність синтезу ДНК *in vivo* у мишей має місце через 12 - 36 год (селезінка), 24 - 36 год (тимус), 24 - 36 год (кістковий мозок) після введення ПГ.

4. Пептидоглікани в концентрації 200 мкг/мл найбільш ефективно стимулюють мітогенний ефект тимоцитів і спленоцитів, а також В- і Т-лімфоцитів мишей. форболмиристатацетат здійснює синергічну дію на мітогенну відповідь лімфоцитів, котра індукується пептидогліканами, а поліміксин В (неспецифічний інгібітор протеїнкінази С) інгібує цю дію.

5. Спленоцити, виділені через 1, 6 і 24 год після опромінення мишей з попереднім використанням ПГ чи ПГ в комбінації з серотоніном, зберігають більш виражену здатність мітогенної відповіді на ЛПС і КоНА, в порівнянні зі спленоцитами, виділеними із опромінених тварин.

6. Пептидоглікани із *S. aureus* і *Br. flavum* індукують перерозподіл активності протеїнкінази С між цитозольною і мембранною фракціями при їх внесенні в середовище інкубації (через 30 і 150 хв після внесення).

7. При умові використання ПГ за 24 год до опромінення, спленоцити, виділені через 6 год після опромінення, характеризуються менш вираженою транслокацією протеїнкінази С в цитозольну фракцію і більш вираженою транслокацією у мембранну фракцію, порівнянно з транслокацією в спленоцитах, виділених через 6 год після опромінення без застосування ПГ.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Блюм И. А., Позур В. К., Цудзевич Б. А., Кучеренко Н. Е. Активация генома В- и Т-лимфоцитов мышей пептидогликанами бактериального происхождения // X Всесоюз. симпозиум "Структура и функции клеточного ядра" (Гродно, 10-14 октября 1990 г.): Сб. тез. - Гродно. - 1990. - с. 37.

2. Блюм И. А., Позур В. К., Цудзевич Б. А. Бактериальные пептидогликаны: механизмы активации генома В- и Т-лимфоцитов мышей // I Иммунологический съезд Белоруси "Экологические проблемы иммунологии и аллергологии" (Минск, 19-20 ноября 1990 г.): Тез. докл. - Минск. - 1990. - с. 5-6.

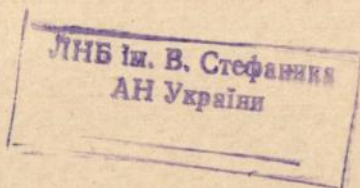
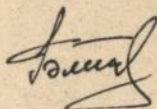
3. Блюм И. А., Позур В. К., Цудзевич Б. А., Кучеренко Н. Е. Активация пептидогликанами клеточных стенок *Staphylococcus aureus* и *Brevibacterium flavum* интенсивности синтеза ДНК в иммунокомпетентных органах мышей // Докл. АН УССР. Сер. В. - 1990. - N 7. - С. 68-71.

4. Позур В. К., Блюм И. О., Фуртат И. М., Згонник В. В. Влияние пептидогликанов грампозитивных бактерий на бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата мышей // Вісник Київського університету. Хіміко-біол. науки та науки про Землю. - 1991. - N 4. - С. 40-43.

5. Позур В. К., Блюм И. А. Особенности поликлонального действия и иммуномодулирующей активности бактериальных пептидогликанов у оп-

позитнореагуючих ліній мишей // Журнал. мікробіол. епідеміол. і
іммунології. 1992. - N 1. - С. 57-61.

6. Блюм І.О., Позур В.К., Цудзевич Б.О., Кучеренко М.Є. Зміни
інтенсивності синтезу ДНК у імунокомпетентних тканинах мишей пепти-
догліканами бактеріального походження // Укр. біохім. журнал. -
1992. - Т. 64, N 3. - С. 39-45.



Підписано до друку 25.04.94р Формат 60x84/16

Папір друк. Умов. друк. л. І.О. Тираж 100 примірник. Заказ №722

Надруковано ЦУОП ДНП "Плодвінконсерв" м. Київ, Саксаганського, 1

AB 30.037

AB 30.037