

АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ

На правах рукопису

СЕЛИЩЕВА МАРІНА ЮРІЇВНА

**МЕХАНІЗМ ДІЇ НЕПЕПТИДНОГО МИТОГЕННОГО ЧИННИКА ТИМУСУ
НА МЕТАБОЛІЗМ ПУРИНІВ В ТИМОЦИТАХ ТА НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ
АКТИВНІСТЬ ЦИХ КЛІТИН.**

03.00.04 - біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1995



00777933 (-)

Дисертація є рукопис

Робота виконана в Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України

Наукові керівники -

доктор медичних наук, професор Безверщенко І.А.,
член-кореспондент АМН України, професор Тронько М.Д.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук Мікоша А.С.
кандидат біологічних наук Мельник І.М.

Провідна установа: Інститут геронтології АМН України

Захист відбудеться "20" 04 1995 р. о __ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради з біохімії при інституті фармакології та токсикології АМН України (252057, Київ, вул. Єжена Потьє, 14).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Українського Інституту фармакології та токсикології МОН України

Автореферат розісланий "15" 03 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор медичних наук,

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України


Серета П.І.

Актуальність проблеми. Вивчення чинників, що контролюють відновлення тимусу після стресу (іонізуюче опромінення, гіперкортицизм, інфекційні захворювання та ін.) та біохімічних механізмів цього контролю є важливим завданням, оскільки використання таких чинників дозволило б прискорити регенерацію тимусу і таким чином сприяти більш швидкому та повному відновленню імунних функцій організму.

Регуляція проліферативної активності тимоцитів здійснюється, зокрема, чинниками, що секретуються Т-лімфоцитами - наприклад, інтерлейкіном - 2, ростовим пептидом, непептидним мітогенним чинником тимусу.

Особливості пуринового метаболізму в Т-лімфоцитах також суттєво впливають на проліферацію цих клітин. Так, знижена в порівнянні з іншими тканинами активність ферменту метаболізму пуринів - пуриннуклеотидфосфорилази, що має місце в лімфоцитах, призводить до накопичення в клітинах дезоксигуанозину у токсичних для них концентраціях. Однак, обмеження проліферації, викликане дезоксигуанозином, може бути відмінене дезоксицитидином (для субкапсулярних кортикальних тимоцитів) або гіпоксантином (для зрілих медулярних тимоцитів та тимоцитів периферичної крові) (С. Penit, K. Papiernik 1986).

Непептидний мітогенний чинник тимусу (НМЧ), який являє собою низькомолекулярну фракцію екстракту тимусу телят ($M_n < 1000$), одержану осадженням іонами ртуті, *in vivo* прискорює відновлення тимусу мишей та щурів після дії глюкокортикоїдів (Беавершенко І.А., Гойдаш М.М. 1989). Тимоцити тварин, яким після обробки гідрокортизоном вводили чинник *in vivo*, мали підвищений рівень проліферативної активності, що визначалась по включенню радіоактивної мітки тимідину до ДНК *in vitro* протягом 3-х годин.

З другого боку, НМЧ асуває катаболізм аденілової кислоти в кортизонрезистентній популяції тимоцитів мишей в бік накопичення гіпоксантину. Показано також, що гіпоксантин прискорює включення тимідину до ДНК кортизонрезистентних мишиних тимоцитів (Безвершенко І.А., Гойдаш М.М 1992).

Таким чином, отримані раніше дані дозволяють отверджувати, що НМЧ діє на кортизонрезистентну популяцію тимоцитів з одного боку, як стимулятор включення тимідину до ДНК, а з другого - як чинник, що впливає на метаболізм пуринів і призводить до накопичення гіпоксантину в тимоцитах. Мітогенна дія НМЧ полягає в прискоренні регенерації тимусу після дії гідрокортизону.

В той же час залишились неа'ясованими такі дуже важливі питання, як визначення субпопуляції тимоцитів у складі кортизонрезистентної популяції, що становить об'єкт дії НМЧ; біохімічний механізм впливу НМЧ на метаболізм пуринів в клітинах-мішенях; біологічна доцільність накопичення гіпоксантину в присутності НМЧ та тип синтезу ДНК, який прискорюється чинником за умов трьохгодинної інкубації.

Метою роботи було дослідження важливих моментів біохімічного механізму дії НМЧ: впливу чинника на метаболізм пуринів в тимоцитах та проліферативну активність цих клітин.

Основні завдання дослідження:

1. Визначення клітинної популяції, яка являє собою об'єкт дії чинника.
2. Встановлення біохімічного механізму впливу НМЧ на метаболізм пуринів в тимоцитах.
3. Дослідження біологічної доцільності накопичення гіпоксантину в тимоцитах, що відбувається під впливом НМЧ.
4. Визначення типу синтезу ДНК (реплікативний чи репара-

тивний), на який впливає НМЧ в перші 3 години мітогенної стимуляції.

Наукова новизна. Встановлені принципові моменти дії НМЧ на біохімічному та клітинному рівні. Доведено, що ані неарілі попередки тимоцитів, ані макрофаги, якими збагачена кортизонрезистентна популяція тимоцитів, не є мішенню дії НМЧ; чинник діє безпосередньо на медулярні тимоцити арілого фенотипу, що несуть на своїх мембранах рецепторів до лектину арахіса (P⁺-тимоцити).

Проведене кінетичне дослідження пуриннуклеозидфосфорилазної реакції в P⁺-тимоцитах щурів. Стримані оригінальні дані, які свідать про те, що НМЧ активує ключовий фермент синтезу пуринів в тимоцитах - пуриннуклеозидфосфорилазу (PNP), що призводить до асуву метаболізму пуринів в бік накопичення гіпоксантину.

Показано, що феномен зняття обмеження проліферації тимоцитів гіпоксантиним видоспецифічний і залежить від ступеню арілості тимоцитів.

Встановлено, що при стимульованій проліферації, при зростанні потреби в пуринах (які лімітують проліферативну активність арілих тимоцитів), гіпоксантин використовується як депо пуринів.

Показано, що підсилення включення Thd до ДНК тимоцитів у присутності чинника в перші 3 години інкубації пов'язане зі стимуляцією репараційних процесів у клітинах.

Практична цінність роботи: В роботі досліджений непептидний мітогенний чинник, який являє собою складову частину фармакологічного препарату вілозен. Розуміння біохімічних основ дії препарату сприятиме його більш ефективному використанню як за вже відомими призначеннями, так і за новими -

тими, що впливають з отриманих експериментальних даних: здатності активувати РNP і, як наслідок, забезпечувати клітини резервом пуринів та прискорювати репараційні процеси в тимоцитах.

На базі НМЧ в перспективі можлива розробка нового медичного препарату, що міг би бути застосований для корекції імунodefіцитних станів, викликаних пригніченням тимусу.

Нами доведено, що НМЧ активує пуриннуклеозидфосфорилазу, тоді як всі відомі сполуки, що впливають на цей фермент, є його інгібіторами. Можливість активації РNP важко переоцінити, оскільки з недостатньою активністю цього ферменту пов'язані важкі імунodefіцити. Це важливо практично у всіх ситуаціях, коли має місце пригнічення цитокриної функції тимусу. В роботі показана принципова можливість застосування НМЧ у випадках, коли стресова ситуація привела до значних ушкоджень клітин тимусу на рівні нуклеїнових кислот і стимуляція репараційних процесів конче необхідна.

Особистий внесок автора у розробку наукових результатів, що виносяться на захист, полягає у виконанні всього обсягу експериментальної частини дисертації, підбору та обробки літературних даних, а також, разом з керівниками, аналізу та інтерпретації отриманих результатів.

Основні положення, що виносяться на захист:

1. Дія НМЧ спрямована на зрілі медулярні тимоцити, що не мають рецепторів до лектину арахіса.
2. Мітогенна дія НМЧ реалізується шляхом активації ключового ферменту катаболізму пуринів в тимоцитах - пуриннуклеозидфосфорилази.
3. Гіпоксантин, що накопичується в тимоцитах внаслідок

активації пуриннуклеозидфосфорилази непептидним мітогенним чинником, використовується як резерв пуринів в клітині при стимулюванні проліферації.

4. Непептидний мітогенний чинник активує репараційні процеси в тимоцитах арілого фенотипу (поабавлених рецепторів до лектину арахіса).

Апробація роботи. Матеріали роботи були представлені на спільному засіданні лабораторій Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка у 1994 році, на симпозіумі країн СНГ "Клинические и экспериментальные аспекты клеточной сигнализации", Європейському конгресі по алергології та клінічній імунології (Роттердам, 1993), на V з'їзді ендокринологів України "Сучасні проблеми експериментальної та клінічної ендокринології" (Івано-Франківськ, 1994).

Публікації. Матеріали дисертації викладені в 5 наукових роботах.

Структура та обсяг роботи. Дисертація викладена на 101 сторінці друкованого тексту і складається із вступу, огляду літератури, 4 розділів власних експериментальних досліджень, висновків та списку використаних літературних джерел з 126 найменувань. Ілюстративний матеріал подано в 16 рисунках та 4 таблицях.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В дослідях використано 180 самців щурів лінії Вістар та 580 мишей лінії СВА, що утримувались в стандартних умовах в віварії Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України, Київ.

В роботі користувалися непептидним мітогенним чинником, виділеним з вілогену (Бевершенко І.А., Дюговская Л.А. 1978) в лабораторії молекулярних механізмів імунітету.

Для отримання кортизонрезистентних тимоцитів тваринам внутрішньочеревно вводили гідрокортизон (для мишей одноразово 1мг в 0,2 мл фізіологічного розчину, для щурів - по 5 мг в 1 мл фізіологічного розчину протягом двох діб). Тимоцити виділяли загальноприйнятим методом.

Побавлення кортизонрезистентної популяції тимоцитів від макрофагів проводили на сефадексі G-10 (Д. Клаус, 1990).

Для відділення відносно зрілих тимоцитів від незрілих користувалися лектином арахісу (PNA) (Y.Reisner, 1979).

Вплив НМЧ на накопичення гіпоксантину (Нх) досліджували по розподілу радіоактивної мітки ($8\text{-}^{14}\text{C}$)-АМР серед її катаболітів (Бевершенко І.А., Гойдаш М.М. 1989).

Вплив НМЧ та Нх на проліферативну активність клітин вивчали по включенню ($2\text{-}^{14}\text{C}$)Thd до ДНК тимоцитів різних популяцій. Гіпоксантин, як сполуку, що має впливати на проліферацію тимоцитів, випробували в діапазоні концентрацій від 0,5 мкг/10⁶ клітин до 50 мкг/10⁶ клітин.

Вплив гіпоксантину (4 мкг/10⁶ клітин) на стимульовані НМЧ тимоцити (1,25 мкг/10⁶ клітин) вивчали, порівнюючи результати впливу гіпоксантину та чинника поодиночки на включення тимідину до ДНК і їх сумісної дії.

Дослід, щодо видової різниці в співвідношенні рівнів ендогенних чинника та гіпоксантину проводили за схемою: по 2 мл тотальних популяцій тимоцитів мишей і щурів ($5 \cdot 10^7$ клітин/мл) інкубували в середовищі RPMI в целофанових діалізних мішках, що пропускають сполуки з $M_w < 1000$. Діаліз в обох випадках проводили проти 8 мл RPMI протягом 3 год. По закін-

ченню діалізу кількість мертвих клітин, визначена методом виключення барвника (еритроасину), становила 8 %. Вивчали включення міченого тимідину до ДНК арілих тимоцитів щурів під впливом обох діаліатів в присутності гіпоксантину чи без нього в порівнянні з такими контролями: тимоцити, інкубовані у RPMI ; тимоцити, інкубовані у RPMI в присутності чинника (позитивний контроль). Інкубація тривала 3 год. за 37⁰С в атмосфері, що містила 5% CO₂. Проби наносили на фільтри, обробляли трихлороцтовою кислотою та етиловим спиртом. Рівні радіоактивності визначали на лічильнику "Beckman LS-5000".

Щоб визначити, на який саме тип синтезу ДНК діє НМЧ на протяжі перших 3-х годин активації, вивчали вплив НМЧ на включення міченого тимідину до ДНК, але в умовах блокування реплікативного синтезу N-етилmaleїнімідом (NEM) в концентрації 3 мкмоль/л. Перед 3-годинною інкубацією проводили 15-хвилинну передінкубацію із NEM, після чого в досліджувану пробу додавали НМЧ, а в контрольну - рівний об'єм середовища.

Кортизонрезистентні PNA⁻-тимоцитів щурів в 0,01 М фосфатносолевому буфері, рН 7,4, з 0,4 М полівінілпіролідонем та 0,2 % EDTA, руйнували трикратним заморожуванням - відтаванням, після чого залишки клітин осаджували 20-хвилинним центрифугуванням при 3000 об/хв. Надосадову фракцію використовували як джерело ферменту для визначення пуриннуклеозид-фосфорилазної активності. Для коректного визначення активності PNP та впливу на неї непертидного мітогенного чинника провели кінетичне дослідження активності PNP арілих PNA⁻-тимоцитів щурів в реакції перетворення Guo в Gua. Кінетичні властивості ферменту вивчали за допомогою методу початкових

швидкостей, щоб зневажити накопиченням продукту та витратою субстрату, які ускладнюють аналіз повної кінетичної кривої. Початкові швидкості були обчислені як тангенси дотичних до кінетичних кривих, отриманих при 5 різних концентраціях субстрату, в нульовий момент часу. Величину K_m оцінювали за залежністю початкових швидкостей реакції фосфоролізу гуанозину від концентрації субстрату, використовуючи прямі лінійні координати Ейзенталя та Корніш-Боудена. Концентрацію ферменту виражали через величину, їй пропорційну - через концентрацію клітин, від яких одержано клітинний екстракт. Концентрацію клітинного екстракту варіювали в діапазоні $0,1 - 10 \cdot 10^6$ кл./мл. Для дослідів по вивченню активності PNP та дії на неї чинника використовували клітинний екстракт, отриманий від $6 \cdot 10^6$ кл./мл.

Визначення активності PNP проводили в $0,05$ М фосфатно-сольовому буфері, рН $7,4$, при 37°C протягом 10 хвилин контролюючи перетворення радіоактивно міченого гуанозину в гуанін.

Статистична обробка даних проведена за стандартними програмами.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

До цього часу питання про те, яка клітинна популяція є об'єктом дії НМЧ, не було вирішене, оскільки кортизонрезистентна популяція тимоцитів, на яку показана дія чинника (Безвершенко І.А., Гойдаш М.М.1991) досить гетерогенна за своїм складом. До неї, крім фенотипово зрілих тимоцитів, входять макрофаги та незрілі попередники тимоцитів. Отже, щоб визначити клітини, що являються мішенню для НМЧ, ми КР-тимоцити відділили від макрофагів і незрілих PNA⁺-тимоцитів, після чого двома методами: по впливу на катаболізм AMP

та по включенню міченого тимідину до ДНК перевірили, чи позначилась відсутність цих клітинних популяцій на чутливості арілих PNA⁻-тимоцитів, що залишились, до дії НМЧ. Результати досліджень дії НМЧ на катаболізм міченої АМР (рис.1) показують, що чинник значно збільшує накопичення Нх КР-популяцією тимоцитів, позбавленою макрофагів у порівнянні з загальною КР-популяцією.

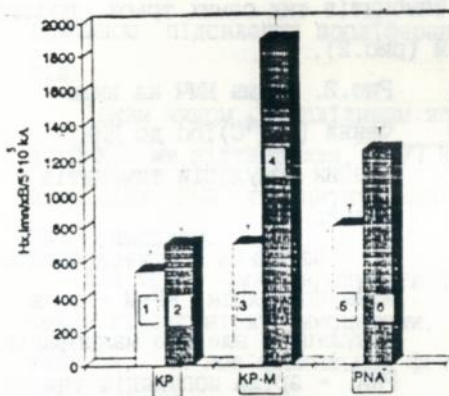


Рис.1. Вплив НМЧ на включення мітки (8-¹⁴C)АМР до Нх у різних популяціях тимоцитів мишей. КР - загальна кортизонрезистентна популяція; КР-М - та ж популяція, але без макрофагів. PNA⁻ - аріла популяція тимоцитів, що не мають рецепторів до лектину арахіса. 1,3,5- не стимульовані клітини; 2,4, 6-клітини, стимульовані НМЧ. * P<0,01 (всі досліді в порівнянні до відповідних контролів).

Певно, посилення накопичення Нх (КР-М)-популяцією в порівнянні з загальною КР-популяцією, пов'язане з тим, що на колонці затримуються, окрім макрофагів, інші клітинні популяції, які не стимулюються чинником (біля 50% нанесених на колонку клітин). Найбільш ймовірно, це неарілі тимоцити, які мають більшу адгезію до вуглеводнів. Отже, ми встановили, що відсутність макрофагів не заважає дії НМЧ, тобто, чинник діє безпосередньо на тимоцити. Щоб впевнено сказати, на яку саме субпопуляцію тимоцитів діє НМЧ, арілі медулярні тимоцити були відділені від неарілих клітин за допомогою лектину арахі-

са. Результати свідчать, що НМЧ діє саме на PNA⁻ тимоцити зрілого фенотипу, в найбільшій мірі (у порівнянні з нерозділеною кортизонрезистентною популяцією) зсуваючи катаболізм АМР у бік накопичення Нх (рис.1).

Висновок, що саме зрілі тимоцити є об'єктом дії НМЧ, ми підтвердили також другим методом: порівнювальним дослідженням впливу НМЧ *in vitro* на включення міченого Thd при 3-х годинній інкубації до ДНК тимоцитів тих самих трьох досліджуваних клітинних популяцій (рис.2).

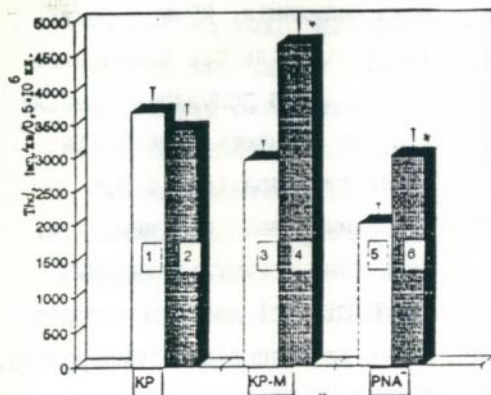


Рис.2. Вплив НМЧ на включення (2-¹⁴C)Thd до ДНК різних популяцій тимоцитів мишей.

KP - загальна кортизонрезистентна популяція; KP-M - та ж популяція, але без макрофагів.

PNA⁻ - зріла популяція тимоцитів, що не мають рецепторів до лектину арахіса. 1,3,5- не стимульовані клітини; 2,4,6- клітини, стимульовані НМЧ.

*P<0,01 (всі досліді в порівнянні до відповідних контролів).

Результати, представлені на рис.2, показують, що спонтанна проліферація тим нижча, чим більш зріла клітинна популяція (загальна KP-популяція - 3685±157 імп/хв; зріла PNA⁻-популяція - 2000±187,65 імп/хв), що узгоджується з літературними даними. НМЧ істотно посилює за 3 год включення Thd до ДНК зрілих PNA⁻- тимоцитів - в 1,5 рази, в той же час не впливає на тимоцити загальної KP- популяції. Позбавлення від

макрофагів, як і у випадку з накопиченням Нх, не тільки не заважає дії чинника, а навпаки, потенціює її. Крім пояснення цього ефекту, пов'язаного з затриманням на сефадексі разом з макрофагами інших клітинних популяцій, на які не діє НМЧ, можливе і інше. Як відомо, макрофаги секретують багато біологічно активних сполук, серед них і ті, які пригнічують проліферацію тимоцитів (простагландин Е). Отже, не виключено, що відсутність таких продуктів діяльності макрофагів є причиною підсилення проліферації в (КР-М)-популяції тимоцитів.

Таким чином, дослідивши вплив НМЧ на включення тимідину до ДНК, ми підтвердили, НМЧ не діє ні на макрофаги, ні на незріліми PNA⁺-тимоцити: НМЧ діє безпосередньо на зрілі PNA⁻-тимоцити.

Для того, щоб зрозуміти біологічну доцільність накопичення гіпоксантину тимоцитами, тобто, знайти відповідь на питання, чи пов'язаний цей феномен з підсиленням проліферації тимоцитів, і якщо так, то яким саме чином, дослідили вплив Нх на включення мітки (2-¹⁴C) тимідину до нуклеїнових кислот тимоцитів. На рис.3 зображені результати дослідів.

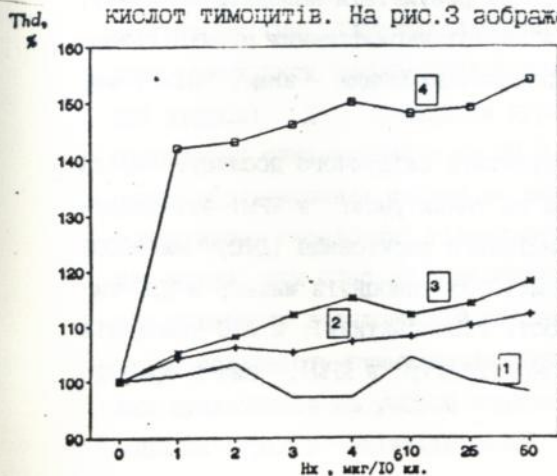


Рис.3. Вплив Нх на включення тимідину до ДНК тимоцитів мишей та щурів.

- 1 - інтактні тимоцити щурів;
- 2 - PNA⁻ тимоцити щурів;
- 3 - інтактні тимоцити мишей;
- 4 - PNA⁻ тимоцити мишей.

Досліди, проведені як для загальної інтактної, так і для зрілої PNA⁻ популяції тимоцитів мишей і щурів показали, що гіпоксантин не впливає на включення тимідину до ДНК загальної популяції тимоцитів мишей, на відміну від зрілої. Не впливає Нх також на включення тимідину до ДНК обох популяцій тимоцитів щурів. Отже, ми дійшли висновку, що вплив Нх на проліферацію тимоцитів залежить від виду експериментальних тварин та ступеню зрілості тимоцитів.

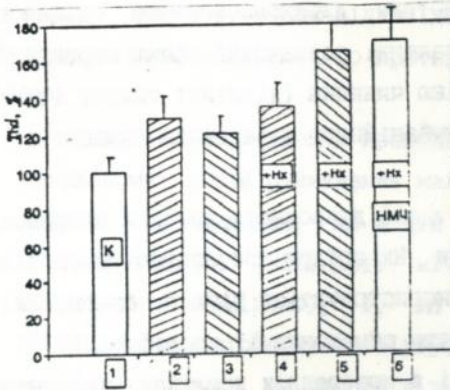
Наступний етап дослідження пов'язаний з вивченням дії Нх на проліферацію клітин, стимульованих НМЧ. Для цього ми порівнювали вплив на включення (2-¹⁴C)Thd до ДНК зрілих тимоцитів щурів гіпоксантину, НМЧ, та Нх разом з НМЧ. Результати досліджень показують, що чинник без Нх підсилює включення тимідину до ДНК тимоцитів щурів на 35%; Нх не впливає на включення тимідину, а найбільший ефект дає чинник, якщо його додати разом з Нх - підсилює включення тимідину на 65%. Для тимоцитів мишей є одна відмінність від результатів, отриманих на тимоцитах щурів: гіпоксантин на 20% підсилює включення тимідину. Ці результати наводять на думку, що у щурів співвідношення внутрішньоклітинних рівнів гіпоксантину та чинника - гіпоксантин/чинник - вище, ніж у мишей.

Це підтверджують результати наступного дослідження. Зрілі тимоцити щурів інкубували за таких умов: в RPMI без додатків; в діалізаті інкубаційного середовища (ДІС, Мм<1000) тимоцитів щурів; в ДІС (Мм<1000) тимоцитів мишей; в ДІС тимоцитів щурів (в присутності гіпоксантину); в ДІС тимоцитів мишей (в присутності гіпоксантину); в RPMI, але в присут-

ності чинника та гіпоксантину (рис.4).

Результати, наведені на цьому рисунку, свідчать, що ДІС тимоцитів мишей в присутності гіпоксантину підсилює включення тимідину до ДНК тимоцитів щурів на 65% у порівнянні з контролем і на 40% у порівнянні з впливом цього ж діалізату без гіпоксантину. Близький результат - 70%

Рис.4. Вплив низькомолекулярних тимічних чинників різного походження та гіпоксантину на проліферацію PNA⁻-тимоцитів щурів.



▨ в діалізаті інкубаційного середовища тимоцитів щурів;
 ▧ - в діалізаті інкубаційного середовища тимоцитів мишей;
 P<0,05 - для всіх дослідів відносно 1; P_{5,3}< 0,001;
 P_{4,3}> 0,05.

дає і чинник в присутності гіпоксантину, що зрозуміло (адже чинник (Mm<1000)-являє собою складову частину саме діалізату екстракту тимусу представників ссавців - великої рогатої худоби). ДІС тимоцитів щурів спричиняє до деякого підсилення синтезу ДНК - на 30%, але його вплив на проліферацію досліджуваних клітин не залежить від присутності в інкубаційному середовищі гіпоксантину. Отже, діалізат тимоцитів мишей, так само як і непептидний мітогенний чинник, асуває рівновагу в ендогенній системі: гіпоксантин - чинник, що надає можливість стимулювати "запасний" шлях синтезу пуринових нуклеотидів за умовою зняття ліміту гіпоксантину. В тимоцитах щурів у співвідношенні внутрішньоклітинних рівнів

гіпоксантину та чинника, мабуть, значно переважає гіпоксантин. У мишей, очевидно, чутливість досліджуваної системи: гіпоксантин - чинник - як до екаогенного гіпоксантину, так і до екаогенного чинника зумовлена відсутністю відносного надлишку ендогенного гіпоксантину.

Отже, отримані результати дозволяють зробити припущення про існування універсального механізму регуляції проліферації тимоцитів арілого фенотипу двохкомпонентною системою: непептидний чинник/гіпоксантин: однаковий ефект отриманий на тимоцитах щурів під дією чинника (діалізат тимусу телят, $Mm < 1000$) та діалізату інкубаційного середовища тимоцитів мишей, $Mm < 1000$.

Таким чином, одержані дані дозволяють зробити висновок: НМЧ стимулює накопичення Нх арілою популяцією тимоцитів, причому накопичений Нх використовується тією ж самою клітинною популяцією для зняття обмеження її проліферації.

Дані, що були отримані в попередніх дослідях лабораторії, давали підставу припустити, що стимулювання чинником накопичення Нх (сполуки, що продукується в переважній кількості з АМР в кортизонрезистентних тимоцитах мишей та щурів), є результатом активуючого впливу НМЧ на РNP досліджуваних клітин.

Ми прослідкували за розподілом радіоактивної мітки серед пуринових метаболітів при додаванні до кортизонрезистентних тимоцитів щурів таких субстратів, як АМР, Адо та Іно. При використанні АМР як субстрату розподілення радіоактивної мітки в продуктах відбувається таким чином: максимальна кількість - в гіпоксантині, в інозині-20-30% від цього рівня, а рівні радіоактивності в аденозині та в АМР дуже незначні - в 10-20 разів нижче, ніж в Іно. Таке ж спів-

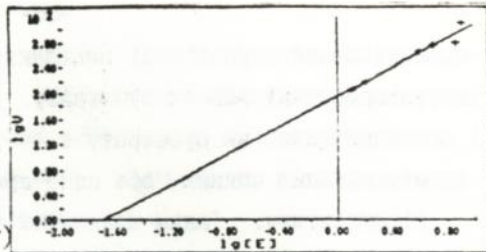
відношення в розподілі радіоактивної мітки залишається при використанні Ado як субстрату. Важливим є той факт, що при використанні як субстрату і AMP, і Ado, і Ino непеptидний мітогенний чинник все одно призводить до підвищення рівня гіпоксантину. Таким шляхом ми дійшли висновку, що НМЧ діє або на стадію перетворення Ino в Hx, активуючи PNP, або ж чинник інгібує фермент гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферазу (HGPRT), який відповідає за синтез IMP з Hx. Хоча останнє малоймовірно, бо протирічить мітогенній активності НМЧ.

Подальші дослідження проводили на клітинному екстракті, одержаному після руйнування клітин та відокремлення їх залишків. Ми показали, що в цій системі відсутні активності 5'-нуклеотидази (кількість міченого AMP протягом досліду залишається незмінною), і, що особливо важливо для нас, HGPRT (з кількістю Hx не відбувається ніяких змін протягом досліду). Отож, ми змогли відкинути можливість інгібуючої дії НМЧ на HGPRT. Те, що не визначається активність 5'-нуклеотидази в цій системі пов'язано з відділенням мембранної фракції (саме з нею зв'язаний цей фермент), а активність HGPRT лімітує фосфорибозилпірофосфат, другий субстрат для HGPRT. Таким чином ми вирішили, що, найвірогідніше, НМЧ впливає на метаболізм пуринів через стимулювання PNP.

Ми встановили порядок реакції по ферменту в перетворенні Guo в Gua в досліджуваній нами ферментній системі. На рис.5 наведено залежність логарифму швидкості від логарифму концентрації ферменту. Величина порядку досліджуваної реакції, отримана у такий спосіб, відповідає з точністю, прийнятою у кінетичних дослідженнях, одиниці.

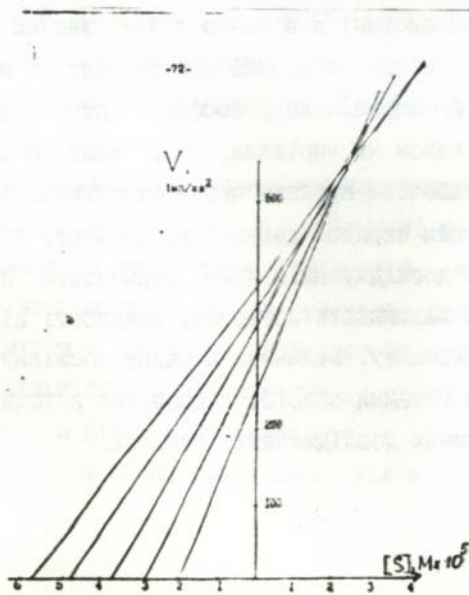
Рис.5. Залежність $\lg V$ реакції $\text{Guo} \xrightarrow{\text{PNP}} \text{Gua}$ від $\lg [E^*]$.

E^* - величина, пропорційна концентрації ферменту)



Для визначення впливу НМЧ на активність PNP ми спочатку встановили значення K_m для реакції, каталізованої PNP, у ферментній системі, отриманій з тимоцитів зрілого фенотипу щурів. Ми визначили початкові швидкості реакції $\text{Guo} \xrightarrow{\text{PNP}} \text{Gua}$ при 5 різних концентраціях субстрату. Графічно, в промих лінійних координатах Ейзенталя та Корніш-Боудена отримали значення K_m реакції перетворення Guo в Gua , каталізованої PNP (рис.6).

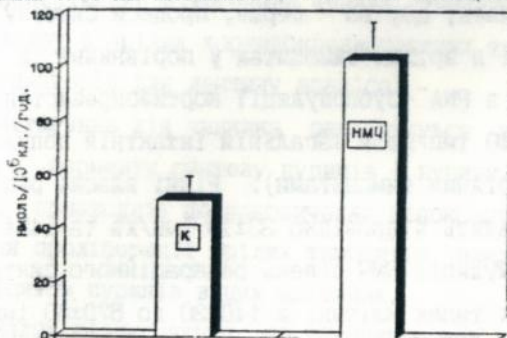
Рис.6. Залежності початкових швидкостей реакції $\text{Guo} \rightarrow \text{Gua}$ від концентрації Guo у вигляді прямого лінійного графіку Ейзенталя та Корніш-Боудена.



Значення K_m , рівне $2,1 \pm 0,6 \cdot 10^{-5}$ М, у реакції перетворення G_{10} в G_{14} , каталізованої PNP зрілої популяції тимоцитів щурів, майже не відрізняється від даних інших авторів для PNP інших видів тварин та різних тканин. Така ситуація, коли K_m для PNP різних видів тварин та різних тканин зберігає близькі значення, тоді як активність ферменту, згідно з даними літератури, має значний розбіг, дозволяє припустити, що PNP чутлива до низькомолекулярних ефекторів, які не впливають на зв'язування субстрату, але впливають на каталітичну ефективність ферменту (неконкурентний вплив).

У ферментній системі, по перетворенню G_{10} в G_{14} , визначали активність PNP та вплив НМЧ на цей фермент в прийнятих умовах (0,05 М фосфатний буфер, рН 7,4, при 37°C на протязі 10 хвилин). Результати свідчать, що в присутності НМЧ активність PNP суттєво підвищується (103 нмоль/ 10^6 клітин/год в порівнянні з 52 нмоль/ 10^6 /год в контролі) (рис.7).

Рис.7. Вплив НМЧ на активність PNP PNA⁻тимоцитів щурів.



Таким чином, ми довели, що накопичення гіпоксантину під дією чинника відбувається через активацію PNP. Це єдиний з відомих природних та синтетичних тимічних чинників, що має таку властивість. Як вже було сказано, мітогенна дія НМЧ на тимоцити була підтверджена *in vivo* по прискоренню відновлен-

ня клітинності та маси тимусу у мишей, оброблених гідрокортизоном, а також по підвищенню цих показників у старих мишей. Показано також, що введення НМЧ *in vivo* мишам, попередньо обробленим гідрокортизоном, підвищувало включення міченого тимідину до ДНК тимоцитів *in vitro*. Наші результати свідчать про те, що додавання НМЧ *in vitro* протягом 3-х годин прискорює включення Thd до ДНК зрілих PNA⁻ тимоцитів щурів та мишей. Але залишилось відкритим питання, на який саме (реплікативний чи репаративний) тип синтезу ДНК впливає чинник в перші три години клітинної активації. Відомо, що реплікативний синтез ядерної ДНК у еукаріот здійснює головний фермент реплікації α - полімераза. Ми блокували її дію N-етилмалеїнімідом (NEM). Ця речовина, однак, не впливає на інтенсивність репараційних процесів. В умовах блокування реплікативного синтезу ми вивчали вплив НМЧ на включення ($2\text{-}^{14}\text{C}$)Thd до ДНК, тобто, власне на репараційний процес. Результати свідчать, що, по - перше, процеси синтезу ДНК практично відсутні в зрілих тимocyтах у порівнянні з незрілими (70 ± 15 імп/хв в PNA⁻-субпопуляції кортизонреактивних тимocyтів та 280 ± 40 імп/хв в загальній інтактній популяції, яка збагачена незрілими тимocyтами). Рівні власне репараційного синтезу становлять відповідно 30 ± 10 імп/хв та 140 ± 30 імп/хв. Але після стимуляції НМЧ рівень репараційного синтезу підвищується в обох типах клітин: з 140 ± 30 до 570 ± 60 імп/хв в інтактній та з 30 ± 10 до 650 ± 80 імп/хв в зрілих. Ці дані свідчать про те, що НМЧ підвищує швидкість спонтанної репарації в тимocyтах як зрілого, так і незрілого фенотипу, але в зрілих значно ефективніше. Можливо, це пов'язано з більшою кількістю пошкоджень, накопичених зрілими тимocyтами в порівнянні з короткоживучими незрілими. Таким чином, можна

сказати, що механізм мітогенної дії НМЧ реалізується через активацію пуриннуклеозидфосфорилази зрілих тимоцитів. Це веде до накопичення гіпоксантину та зняття гіпоксантином блоку проліферації зрілих тимоцитів, пов'язаного з відносним лімітом пуринів в цих клітинах. Гіпоксантин підсилює проліферацію зрілих тимоцитів мишей та щурів, стимульованих непептидним мітогенним чинником, тобто в умовах підвищеної потреби клітин в пуринах. Нестимульовані тимоцити щурів, на відміну від нестимульованих тимоцитів мишей, не реагують на їх підвищенням проліферації. Ми пов'язуємо цей факт з більшою активністю основного пути синтезу пуринів у тимоцитах щурів, про що говорять і літературні дані. Прискорення включення тимідину до ДНК в перші години клітинної активації, викликане НМЧ, пов'язане з активацією репараційних процесів в тимоцитах.

В И С Н О В К И

1. Непептидний мітогенний чинник стимулює синтез нуклеїнових кислот в зрілих кортизонрезистентних тимоцитах, що не мають рецепторів для лектину арахіса.

2. Мітогенна дія чинника реалізується через активацію ключового ферменту синтезу пуринів - пуриннуклеозидфосфорилази, що призводить до накопичення гіпоксантину та зняття обмеження проліферації зрілих тимоцитів, викликаного відносним дефіцитом пуринів в цих клітинах.

3. Вплив гіпоксантину, що накопичується в результаті активації пуриннуклеозидфосфорилази, на спонтанну проліферацію тимоцитів залежить від стадії диференціювання клітин а також від виду тварин: гіпоксантин стимулює спонтанну проліферацію фенотипово зрілих тимоцитів мишей, але не впливає на незрілі тимоцити. На спонтанну проліферацію тимоцитів щурів гіпок-

сантин не впливає незалежно від ступеню зрілості клітин.

4. Гіпоксантин підсилює стимульовану непептидним мітогенним чинником проліферацію зрілих тимоцитів мишей і щурів.

5. НМЧ стимулює репараційні процеси в тимоцитах, що мають високий ступінь диференціювання (клітини, позабавлені рецепторів до лектину арахіса).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ

1. Внутрішньотимічна регуляція проліферації медулярних тимоцитів мишей СВА // Укр. біохім. журн.-1993.- **65**, N 4.- С. 103-108. /співавт. Безверщенко І.А., Премислов В.Х./.
2. Роль системи непептидний чинник тимусу - гіпоксантин в регуляції проліферації зрілих тимоцитів мишей та щурів// Укр. біохім. журн.- **65**, N 2.- С.85-89/співавт. Безверщенко І.А., Премислов В.Х., Бойко М.Г./.
3. Низкомолекулярные интратимические факторы - регуляторы цитокринной функции вилочковой железы //Симпозиум " Клинические и экспериментальные аспекты клеточной сигнализации" (М., сентябрь 1993): Тез. докл.-М., "Инженер".- С.11-12./соавт. Безверщенко В.Х., Премислов В.Х., Гойдаш М.М. и др./.
4. Механізм відновлення цитокриної функції тимусу за умов гіперкортицизму//V З'їзд ендокринологів України "Сучасні проблеми експериментальної та клінічної ендокринології" (Івано-Франківськ, вересень 1994), Тез. допов.- С.52-53. (співавт. Гойдаш М.М., Премислов В.Х.)
5. Biological activity of non-peptide mitogeneic component of antiallergic drug vilosen // Annual Meeting of the

European Academy of Allergology and Clinical Immunology (Rotterdam, the Netherlands, september 1993): abs.N3095 /co-authors Bezvershenko I.A., Premyslov V.H., Gojdash M.M./.

Селищева М.Ю. Механизм действия непептидного митогенного фактора тимуса на метаболизм пуринов в тимоцитах и на пролиферативную активность этих клеток. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Украинский научно-исследовательский институт фармакологии и токсикологии, Киев, 1995.

В работе исследованы важные моменты биохимического механизма митогенного действия непептидного митогенного фактора тимуса (НМФ), являющегося составной частью иммуномодулятора вилозен. Показано, что мишенью действия НМФ являются медуллярные тимоциты зрелого фенотипа, которые не несут на своей поверхности рецепторов к лектину арахиса (PNA⁻-timoциты). Митогенное действие НМФ реализуется путем активации ключевого фермента катаболизма пуринов в тимоцитах - пуриннуклеозидфосфорилазы (PNP). Установлено, что гипоксантин, который накапливается в тимоцитах вследствие активации PNP фактором, используется как резерв пуринов в клетке при стимуляции пролиферации. Показано, что НМФ активирует репарационные процессы в PNA⁻-timoцитах в первые часы клеточной активации.

Selischeva M.J. The mechanism of action of non-peptide mitogeneic factor of thymus on the purine metabolisme in thymocytes and proliferative activity in this cells. The

dissertation for a candidate of biological sciences by specialisation 03.00.04 - biochemistry, Ukrainian Institute of Pharmacology and Toxicology, Kiev, 1995.

The impotent moments of mitogenic action of non-peptide mitogenic factor (NMF) is studied. NMF is a part of Vilosen immunomodulator. It was shown, NMF acts on the medullare thymocytes, which have not the receptors for peanut agglutinine (PNA⁻ - thymocytes). The mitogenic action of NMF is realised by activation of the purine nucleoside phosphorilase (PNP) - the key enzyme of thymocyte purine catabolism. Hypoxanthine accumulates in the thymocytes in the result of PNP stimulation by NMF. It was shown, the hypoxanthine accumulated is used as purine depot in thymocytes in case of stimulation of the proliferation. It was ascertained, the NMF to stimulate the processes of reparation in PNA⁻ - thymocytes at the first hours of the cell mitogenic activation.

Ключові слова: непептидний мітогенний чинник (НМЧ), тимоцити, пуриновий метаболізм, пуриннуклеозидфосфорилаза (PNP), гіпоксантин, проліферація.

Печать офс. Условн. печать лист 2,5 Обл. изд. лист 1,8 тираж 100

Киевское книжное издательство научной книги. Киев, Репина, 4.

1835.111

ВСТУП
1. ЗАДАЧА

ВСТУП

ВСТУП

ВСТУП
ВСТУП
ВСТУП

ВСТУП

ВСТУП

ВСТУП

1197604

AB 32.110

AB 32.110

16-74

143247100