

- Banhegyi et al. // Prostaglandins. – 1988. – V. 36, № 6. – P. 761-772.
13. Effect of PGL₂ in carbon tetrachloride-induced liver injury / E. Ujhelyi, A. Divald, G. Vajta et al. // Acta physiol. hung. – 1984. – V.64, № 3-4. – P. 425-430.
14. Fasting and diabets mellitus elicit opposite effects on agonist-stimulated prostacyclin synthesis by the rat aorta / J.Y. Jeremy, C.S. Thompson, D.P. Mikhailidis et al. // Metabolism. – 1987. – V. 36, № 7. – P. 616-620.
15. Landolfi R., Mower R.L., Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations // Biochem. Pharmacol. – 1984. – V. 33, № 9. – P.1525-1530.
16. Nemoz G., Prigant A.F. Interet pharmacologique des inhibiteurs de la nucleotide cyclique phosphodiesterase // Annales pharmaceutiques francaises. – 1984. – V. 42, №2. – P.99-112.
17. Oliv E. A radioimmunoassay for 6-keto-PgF_{1α} utilizing an antiserum against 6-Methoxime-PgF_{1α} // Prostagl. – 1980. – V.19, №2. – P.272-284.
18. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V.193, № 1. – P.265-275.
19. The role of thromboxane A₂ (TxA₂) in liver injury in mice / H. Nagai, T. Shimazawa, I. Yakuo et al. // Prostaglandins. – 1989. – V. 38, №4. – P.439-446.
20. Uotila P., Dahl M.L. Thromboxane formation during blood clotting is decreased by verapamil // Prostaglandins. – 1984. – №27. – P.48.

Summary

THE ENDOGENIC BIOSYNTHESIS OF PROSTANOIDS AND CYCLIC NUCLEOTIDES IN THE LIVER TISSUE UNDER PRESSURE OF EPICHLORHYDRINE, ITS PHARMACOLOGIC REGULATION

I. Yu. Vysotsky, I.A. Komarevtseva

There were studied in the in vitro experiment the causes of different concentrations of epichlorhydrine (ECH) on the endogenic biosynthesis by the liver tissue of prostanoids (PGI₂, TXB₂), cyclic nucleotides (cAMP, cGMP), and also the opportunity of the pharmacologic regulation of these processes in hepatocytes. It was proved, that in the toxic action mechanism of ECH the special place is taken by the decreasing of cAMP, cGMP and prostacycline concentration in the hepatocytes, and also decreasing of the division of cAMP/ cGMP and PGI₂/TXB₂. The most effective medicines for the correction of the broken balance between cyclic nucleotides, prostacycline and thromboxane B₂ in the liver damage by ECH are acetylcysteine, verapamyle and quercetine. The highest level of cAMP was taken under quercetine's influence. Acetylcysteine, mostly quercetine and verapamyle acted for the increase of PGI₂ level and decreasing of TXB₂ level in hepatocytes. The combined usage of acetylcysteine with verapamyle - the calcium canals' blocker showed the less effect, than these medicines, used separately. It was made a conclusion about the reality of usage of these medicines in the toxic hepatopathy, caused by ECH and other epoxy-jointments, in the base of which stands the processes, where the breakdown of the balance of cAMP/cGMP and PGI₂/TXB₂ takes the main pathogenetic role.

Ministry Public Health of Ukraine

Sumy State University, Medical Dept.

40007, Rimskiy-Korsakov st. 2, Sumy, Ukraine

Матеріал надійшов до редакції 1.03.2000.

© Ножинова О.А., Веснина Л.Э., Кайдашев И.П.

УДК 576.367:612.017.1

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА ТИМУСА НА ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С

Ножинова О.А., Веснина Л.Э., Кайдашев И.П.

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

Вивчено вплив пептидного комплексу тимуса - тімаліна на процеси апоптозу лімфоцитів периферійної крові донорів в умовах активації протеїнкінази С. В якості активатора протеїнкінази С використовували форболмірістацетат в кінцевій концентрації 5 нг/мл. Виявлено, що в периферійних лімфоцитах існують загальні з тимоцитами шляхи розвитку апоптозу, які пов'язані з активацією протеїнкінази С. Встановлено, що комплекс регуляторних пептидів тимуса - тімалін ефективно запобігає розвитку апоптозу лімфоцитів периферійної крові, який викликаний активацією протеїнкінази С, знижує рівень експресії CD95.

В последние годы особое внимание ученых уделяется процессам апоптоза клеток иммунной системы. В подавляющем большинстве работ, посвященных изучению процессов апоптоза клеток иммунной системы, объектом исследования являются прежде всего тимоциты. Как указано в мно-

гочисленных публикациях, после положительной селекции тимоциты подвергаются второму туру отбора - отрицательной селекции. На этой стадии выбраковываются аутореактивные клетки, т.е. тимоциты, чьи рецепторы распознают аутологичные пептиды в составе собственных молекул

главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). В случае распознавания аутологичного комплекса, возникает летальный сигнал, приводящий к развитию апоптоза [5].

Центральную роль в регуляции апоптоза в тимocyтах играет протеинкиназа С [3,7]. Известно, что одним из внутриклеточных сигналов к развитию апоптоза тимocyтов может быть активация протеинкиназы С форболовыми эфирами [8,9].

В тоже время механизмы апоптоза периферических клеток иммунной системы изучены не достаточно. Остается не выясненным, как регулируются эти процессы, какие факторы непосредственно участвуют в реализации программы гибели периферических лимфоцитов. В связи с этим нами начато изучение механизмов развития и регулирования апоптоза лимфоцитов периферической крови.

После эмиграции Т-клеток из тимуса циркулирующий пул лимфоцитов подвергается воздействию различных гуморальных факторов тимуса. Таким образом, актуальным является изучение действия факторов тимуса в регуляции процессов клеточной смерти периферических лимфоцитов.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния пептидного комплекса тимуса - тималина на процессы апоптоза лимфоцитов периферической крови в условиях активации протеинкиназы С.

Методика исследования

Исследование проведено на лимфоцитах периферической крови доноров. Суспензию лимфоцитов получали из гепаринизированной крови (25 ЕД на 1 мл крови) путем добавления 1,8% раствора декстрана (Fluka) в соотношении 2:1 и инкубации при 37°С в течении 1 часа, с последующим отмыванием лимфоцитов физиологическим раствором. Количество клеток в суспензии при подсчете в камере Горяева составляло в среднем 4×10^6 клеток. Суспензию клеток инкубировали в среде RPMI-1640 (ИПВЭ, Москва) с добавлением 10% телячьей сыворотки (BioMark) и антибиотиков: пенициллина в дозе 1 мкг/мл и стрептомицина в дозе 0,5 мкг/мл, в течении 24 часов при температуре 37°С.

В первой серии опытов в среду культивирования добавляли активатор протеинкиназы С, форболмиристацетат (ФМА) (Sigma), в дозе 5 нг/мл [10]. Действие пептидного комплекса тимуса изучали во второй серии при внесении к культивируемым лимфоцитам тималина в дозе 0,12 мкг/мл. В третьей серии опытов последовательно в инкубационную среду добавляли ФМА в дозе 5 нг/мл и полипептидный комплекс тимуса (тималин) в дозе 0,12 мкг/мл. В качестве контроля использовали интактные донорские лимфоциты, инкубируемые в среде культивирования.

ДНК из лимфоцитов выделяли фенол-хлороформным методом и анализировали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле [6]. Динамику расщепления хроматина клеток Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазой определяли по методу [2] с последующей визуализацией продуктов расщепления ДНК тимуса телят ("Reanal") методом электрофореза в 0,8% агарозном геле. Результаты исследований документировали фотографически.

Методом непрямой иммуофлюоресценции определяли экспрессию CD95 на поверхности лимфоцитов с помощью моноклональных антител LT95 (ТОО, "Сорбент", Россия) [4]. Флюоресценцию оценивали на микроскопе ЛЮАМ Р-8 (ЛОМО, Россия).

Данные исследований обработаны статистически с использованием коэффициента Стьюдента.

Результаты исследования

Как показали наши исследования, инкубация лимфоцитов в присутствии ФМА в дозе 5 нг/мл, которая по литературным данным [10] приводит к активации протеинкиназы С, вызывала появление фрагментации ДНК в виде "лестницы" (фото 1), усиление активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы, что видно из уменьшения полосы, присутствующей нативной ДНК (фото 2).



Фото 1. Электрофорез ДНК периферических лимфоцитов доноров при воздействии ФМА и тималина. 1—ДНК контрольных клеток; 2—ДНК лимфоцитов, подвергавшихся воздействию тималина; 3—ДНК лимфоцитов после воздействия ФМА; 4—ДНК лимфоцитов, на которые воздействовали ФМА и тималин.

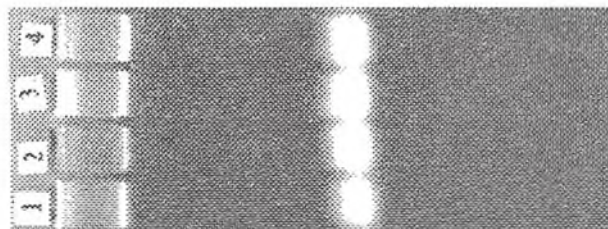


Фото 2. Продукты расщепления ДНК тимуса телят под воздействием Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы периферических лимфоцитов при воздействии ФМА и тималина. 1—продукты расщепления ДНК тимуса телят Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазой интактных лимфоцитов; 2— под воздействием тималина; 3— под воздействием ФМА; 4— под воздействием ФМА и тималина.

Под воздействием ФМА также увеличилась экспрессия CD95 в 2,5 раза по сравнению с интактными лимфоцитами (рис. 1).

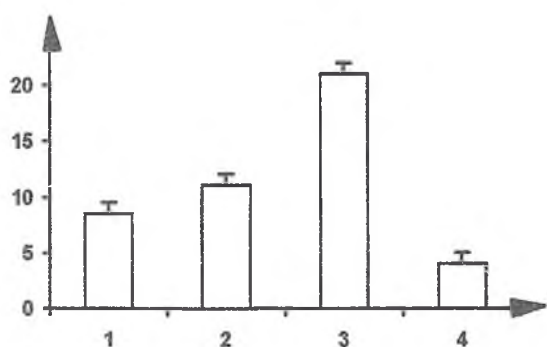


Рисунок 1. Експресія CD95 на поверхності лимфоцитів периферическої крові донорів при действии тималина в умовах активації протеїнкінази С. По осі абсцисс показателі експресії інтактних лимфоцитів (1), лимфоцитів, подвергнувшись действию тималина (2), ФМА(3) и их сочетанному влиянию (4); по осі ординат процент кліток с флуоресценцией; *—<0,05.

При изучении изолированного действия пептидного комплекса тимуса тималина, експресія CD95 не изменялась и ДНК лимфоцитів при електрофоретическом анализе не была фрагментирована. Не отмечалось усиления активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы.

При добавлении в среду культивирования лимфоцитів последовательно ФМА и пептидного комплекса тимуса не изменялась експресія CD95 по сравнению с интактными лимфоцитами и была значительно снижена по сравнению с изолированным воздействием ФМА. Отсутствовала также фрагментация ДНК, усиление активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы не было обнаружено.

Исследованиями Н.Кізакі et al. [8, 9] показано, что форболовые эфиры стимулируют апоптоз тимоцитів протеїнкіназным и кальций-зависимым путями. В наших исследованиях под воздействием ФМА происходила индукция процессов апоптоза периферических лимфоцитів. Поэтому можно предположить, что активация протеїнкіназы С в тимоцитах и периферических лимфоцитах одинаково приводит к индукции апоптотических реакций.

На зрелых лимфоцитах после активации экспрессируется Fas-рецептор. Взаимодействие Fas-рецептора и Fas-лиганда приводит к конформационным изменениям в цитоплазматическом домене смерти Fas-рецептора, что запускает развитие Fas-зависимого апоптоза [5]. В наших исследованиях форболовый эфир увеличивал експресію CD95 на мембранах периферических лимфоцитів, т.е. повышалась готовность клеток к апоптозу, что сопровождалось характерными проявлениями индукции апоптоза в виде усиления активности

Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы и появлением фрагментации ДНК в виде "лестницы".

Пептидный комплекс тимуса - тималин принимает участие в процессах пролиферации и дифференцировки клеток иммунной системы [1]. В нашем исследовании тималин, внесенный вместе с ФМА, эффективно препятствовал развитию каскада апоптотических реакций, что может быть связано с функциональным ингибированием полипептидным комплексом тимуса действия форболмиристеацетата.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что в тимоцитах и периферических лимфоцитах существуют общие пути развития апоптоза, связанные с активацией протеїнкіназы С. Этот внутриклеточный каскад реакций сопровождается значительным усилением експресії CD95 (APO-1) на мембранах лимфоцитів периферической крови. Комплекс регуляторных пептидов тимуса - тималин эффективно препятствует развитию апоптоза лимфоцитів периферической крови, вызванного активацией протеїнкіназы С, снижает уровень експресії CD95.

Таким образом, в организме существует мощная система пептидных биорегуляторов, синтезирующихся в тимусе, направленная на подавление процессов апоптоза лимфоцитів периферической крови. Дальнейшее изучение этих процессов позволит регулировать продолжительность жизни периферических лимфоцитів, активированных для выполнения специфической иммунной функции.

Список литературы

1. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. // Цитомедины. СПб., 1998.
2. Носов Н.В., Кожура В.Л., Новодержкина С. Об инициации апоптоза в гепатоцитах при длительной артериальной гипотензии и в постреанимационный период // Бюл. эксперим. биол. и мед.-1998.-Т.125.-№3.-С.285-288.
3. Робинсон М.В., Труфакин В.А. Апоптоз клеток иммунной системы // Усп. соврем. биол.-1991.-Т.111.-№2.-С.246-259.
4. Фримель Г. Иммунологические методы. -М., 1987.
5. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // Патол. физиол. и эксперим. терап. -1998.-№2.-С.38-48.
6. Azuma G., Onishi G., Sato G., Kizaki H. Effects of protein Tyrosine Kinase inhibitors with. Different Modes of Action on Teroisomerase activity and Death of IL-2 dependent CTLL-2 cells // J. Biochem.-1995.-N118. -P.312-318.
7. Kizaki H., Tadakuma T. Tumor cell apoptosis // Microbiol Immunol.-1993.-N 37.-P.917-925.
8. Kizaki H., Tadakuma T., Odaka C., Muramatsu J. and Ishimura Y. Activation of a suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by calcium ionophores and phorbol esters // J. Immunol.-1989.-N 143.-P.1790-1794.
9. Kizaki H., Suzuki K., Tadakuma T. and Ishimura Y. Adenosine receptor-mediated accumulation of cyclic AMP-induced T-lymphocyte death through internucleosomal DNA cleavage // J Biol Chem.-1990.-N 265.-P.5280-5284.
10. Nishimoto Y., Onishi Y., Sato Y. and Kizaki H. Protein synthesis dependent and independent apoptosis of murine splenic T cell // Bull. Tokyo dent. Coll.-1997.- Vol.38.-N 2.-P.133-138.

Summary

THE INFLUENCE OF THYMIC PEPTIDE COMPLEX ON THE APOPTOTIC PROCESS IN PERIFERAL BLOOD LYMPHOCYTES BY PROTEINKINASE C ACTIVATION

Nozhinova O.A., Vesnina L.E., Kaidashev I.P.

The influence of thymus peptide complex - thymalinum on apoptotic process in periferal blood lymphocytes was studied by Proteinkinase C activation (4-phorbol-12-miristate-13-acetate 5 ng/ml). The common pathway of the thymocytes and periferal lymphocytes apoptosis was bound out. This pathway connected with Proteinkinase C activation. The thymic peptide complex thymalinum prevents the development of periferal lymphocytes apoptosis induced by Proteinkinase C activation and decreases the membrane expression of CD95 (APO-1).

Ukrainian Ministry of Health Public Service,
Ukrainian Medical Stomatological Academy,
Shevchenko Str. 23, 36024 Poltava, Ukraine.

Матеріал надійшов до редакції 29.03.00

ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ МЕДИЦИНИ

© Югов В.К., Сидора В.Д., Баштан В.П., Одабашьян А.Л.

УДК: 616.006.6:614.1

КОМПОНЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОБРАЗОВАНИЯМИ У МУЖЧИН ПОЛТАВСКОЙ ОБЛАСТИ, ПРОЖИВАЮЩИХ В СЕЛЬСКОЙ МЕСТНОСТИ И ПОТРЕБЛЯЮЩИХ ВОДУ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ФТОРА В 1989 Г. ПО СРАВНЕНИЮ С 1979 Г.

Югов В.К., Сидора В.Д., Баштан В.П., Одабашьян А.Л.

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

За допомогою методу компонентного аналізу динаміки захворюваності вивчено в якій мірі приріст захворюваності на рак у чоловіків сільської місцевості Полтавської області в 1979-1989 р. зумовлений справжнім збільшенням кількості хворих, а в якому зв'язку пов'язаний із зростанням кількості населення та його постарінням. Дана оцінка природству онкозахворюваності населення районів, що вживають воду в підвищеному вмістом фтору (I регіон) та нормальною його кількістю (II регіон). Знайдено, що у чоловіків I регіону в порівнянні з чоловіками II приріст кількості хворих на рак по більшості локалізацій зумовлений ризиком захворіти, а не ростом чисельності населення і його постарінням. Приріст кількості чоловіків, що захворіли на рак, визначений і ростом чисельності населення в II регіоні більш виражений, ніж в I регіоні.

В настоящее время многие онкологи считают, что возникновение большинства случаев рака связано с действием факторов внешней среды и прежде всего химических канцерогенов. Известно, что при старении количество заболевших злокачественными новообразованиями возрастает. С этой точки зрения прирост частоты заболевания раком объясняют увеличением с возрастом экспозиции к действию канцерогенных факторов.

Изучение содержания фтора в питьевой воде населенных пунктов с централизованным водоснабжением районов Полтавской области за период с конца 1980 годов по настоящее время показало [8], что как и ранее [4] в Гребенковском, Диканьском, Зеньковском, Карловском, Кобеляк-

ском, Лохвицком, Лубенском, Машевском, Миргородском, Новосанжарском, Оржицком, Пирятинском, Полтавском, Решетилковом и Шишацком районах имеется повышенное количество фтора, в среднем 2,26 мг/л. Оно достоверно выше ($p < 0,05$), чем в остальных районах, где среднее содержание фтора в питьевой воде 0,86 мг/л.

Нормальное содержание фтора в питьевой воде 0,7 мг/л [4].

Литературные данные [5,6] показывают, что фтор и его производные кроме общетоксического действия обладают также выраженным мутагенным и канцерогенным действием. Но в то же время, по некоторым сведениям, повышенное содер-