

И. Н. МЕДВЕДЬ, И. А. РАДЮК, В. И. ЛЕВИН,  
И. Н. МЕДВЕДЕВА, Т. В. ШИМАНСКАЯ, А. И. СВИРНОВСКИЙ

## ЛЮМИНОЛЗАВИСИМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ОБЛУЧЕННЫХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ АДГЕЗИИ НА СТЕКЛО И ДЕЙСТВИИ КОНКАНАВАЛИНА А

При воздействии рентгеновского облучения на организм наиболее ранние и значительные изменения наблюдаются в иммунной системе и, в частности, в ее клеточных элементах, которые циркулируют в периферической крови. Самыми чувствительными клетками крови являются лимфоциты [1], специфическая активность которых сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК) [2, 3].

Методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) изучено влияние облучения на способность лимфоцитов периферической крови человека (ПКЧ) генерировать АФК при адгезии на стекло, взаимодействии с ионами кальция и Конканавалином А (КонА) в присутствии или в отсутствие в суспензии биологического регулятора из ткани селезенки.

### Материал и методика

Лимфоциты ПКЧ выделяли из дефибринированной крови в градиенте плотности фиколл-верографин аналогично [4]. Морфологический контроль показал, что 98 % общего числа клеток составляли лимфоциты. Количество жизнеспособных клеток по трипановому тесту 97 %.

Биологический регулятор получали из ткани селезенки телят с помощью метода водной экстракции и лиофилизации. Регенерацию селезенки вызывали ее предварительным фармакологическим повреждением [5]. Сокращенное название экстракта регенерирующей селезенки — эрсел.

Рентгеновское облучение лимфоцитов проводилось в пластиковых чашках Петри на установке РУМ-17 дозой 15 Гр с использованием алюминиевого фильтра толщиной 11 мм, помещенного на расстоянии 300 мм от источника. Перед облучением в каждую чашку помещали 5 мл суспензии лимфоцитов с концентрацией порядка  $8 \cdot 10^6$  мл<sup>-1</sup> в присутствии или в отсутствие эрсела и, в качестве контроля, бычьего сывороточного альбумина (БСА) в концентрациях по 1 мг/мл.

Измерение люминолзависимой ХЛ проводили при комнатной температуре на установке, описанной в [6]. Перед измерением ХЛ клетки осаждали и переводили в сбалансированный солевой раствор Эрла (рН 7,4), не содержащий ионы кальция. Адгезию лимфоцитов проводили в цилиндрической кварцевой кювете диаметром 4 см. Концентрация клеток составляла  $2 \cdot 10^6$  мл<sup>-1</sup>, эрсела и БСА — 50 мкг/мл, Кон А — 25 мкг/мл, люминола —  $3 \cdot 10^{-6}$  М.

В работе использовался Кон А Фирмы «Sigma», остальные препараты отечественного производства.

### Результаты и их обсуждение

В процессе адгезии лимфоцитов на стекло наблюдается рост интенсивности ХЛ с максимумом через 3 мин после помещения клеток с люминолом в кювету. Данные, представленные на рис. 1, 1 для необлученных контрольных клеток «К», совпадают с результатами работы [4], в которой показано, что ХЛ лимфоцитов при адгезии обусловлена генерацией клетками АФК, причем кислородоактивирующие системы расположены в плазматических мембранах клеток [2, 4].

Добавление в суспензию клеток «К» ионов кальция (рис. 1, 2) индуцирует резкое нарастание интенсивности ХЛ в течение 30—60 с на фоне ответа, обусловленного адгезией клеток, если лимфоциты были

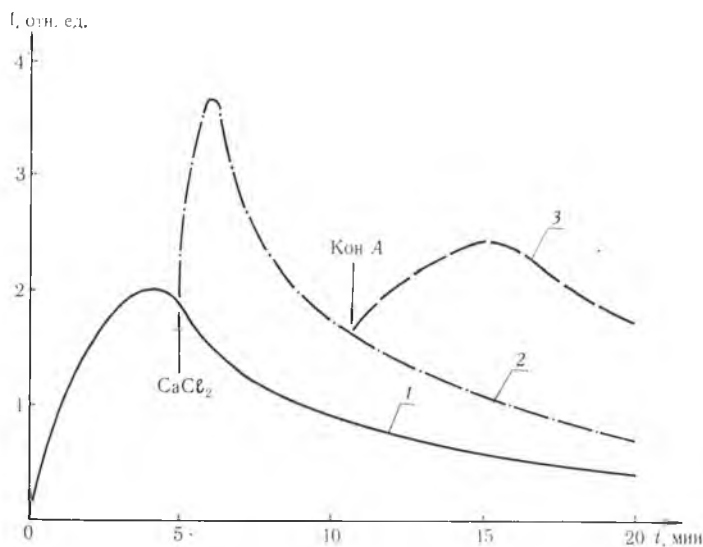


Рис. 1. Хемлюминесценция лимфоцитов ПКЧ:  
 1 — клетки  $+3 \cdot 10^{-6}$  люминола; 2 — клетки  $+3 \cdot 10^{-6}$  люминола  $+2,5 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$ ; 3 — клетки  $+3 \cdot 10^{-6}$  люминола  $+2,5 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$   $+25$  мкг/мл Кон А. Стрелками указано время добавления Кон А и  $\text{CaCl}_2$

предварительно инкубированы в бескальциевой среде Эрла. Как известно [7], кальций содержится в клетках не только в свободном состоянии. В значительных количествах он связан в мембранных системах, может непосредственно взаимодействовать с липидами и оказывать влияние на интенсивность перекисного окисления липидов [8]. Учитывая эти данные, а также быстроту ХЛ-ответа на введение ионов кальция, полученные результаты можно объяснить стимуляцией кислород-активирующих систем плазматических мембран лимфоцитов.

Введение в суспензию клеток «К» Кон А сопровождается ХЛ-ответом лимфоцитов только в присутствии ионов кальция, что совпадает с данными [4] и может объясняться как особенностями поверхности клеток в присутствии кальция, так и конформационным состоянием молекул Кон А, имеющих центры связывания кальция.

По кинетике ответа на введение в суспензию ионов кальция и Кон А полученные нами данные не совпадают с результатами работы [4]. Особенности наблюдаемой нами быстрой реакции обусловлены присутствием в используемой среде ионов магния, биологическая активность которых известна [7].

Значительное количество объектов исследования с затратами времени порядка 30 мин на каждый потребовало выяснения зависимости интенсивности ХЛ при адгезии от времени предварительной инкубации при комнатной температуре в присутствии используемых в работе веществ. В течение всего времени измерений наибольшая интенсивность ХЛ при адгезии зарегистрирована для суспензий, содержащих кальций (в 1,4—1,8 раза выше контрольных), наименьшая — для суспензий, содержащих БСА (в среднем на 15 % меньше контроля). Предварительное истощение клеток по отношению к ионам кальция за 4—5 ч измерений (с интервалом 1—1,5 ч) приводит к уменьшению интенсивности ХЛ для контрольных и содержащих БСА суспензий в среднем в 2 раза, для суспензий с эрселом — в 1,5 раза. За это же время интенсивность ХЛ суспензий, содержащих кальций, уменьшается в 1,7 раза.

Таким образом, способность к продукции АФК кислород-активирующих систем плазматических мембран с течением времени уменьшается в наибольшей степени для контрольных суспензий и с БСА и в меньшей степени для суспензий с кальцием и эрселом.

Облучение лимфоцитов в отсутствие (клетки «О») и в присутствии эрсела в суспензии (клетки «ОЭ») вызывает изменение ХЛ параметров

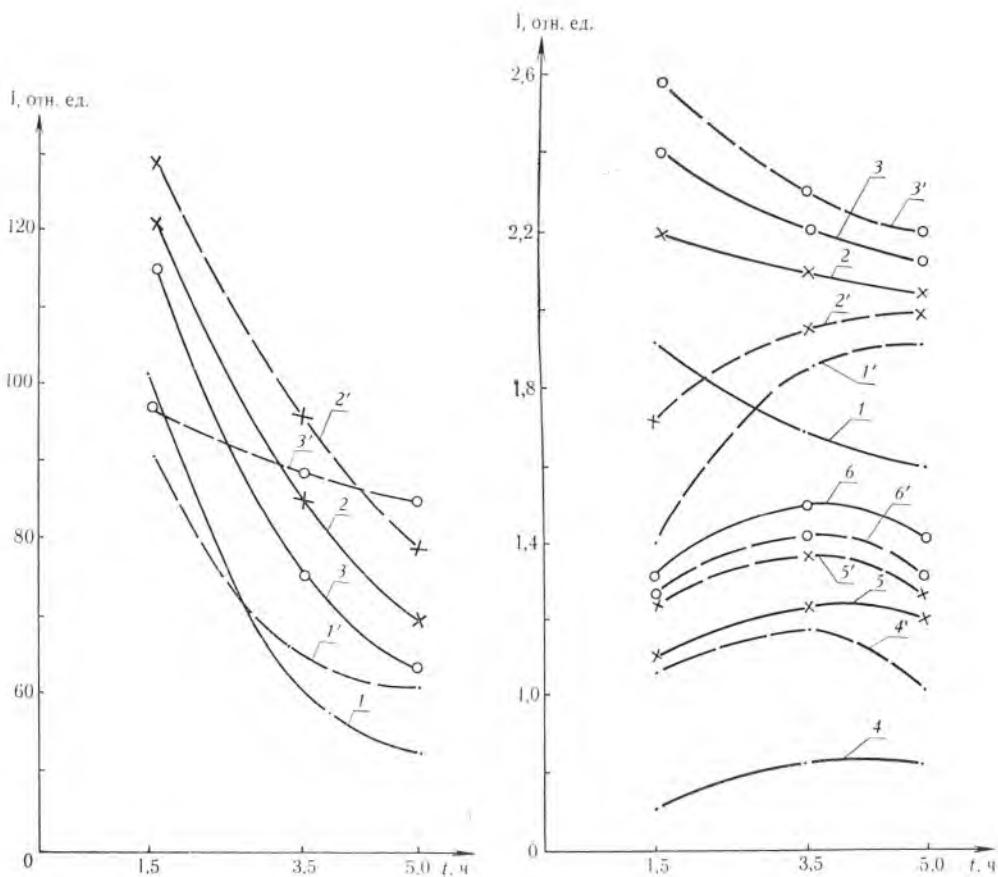


Рис. 2. Зависимость интенсивности ХЛ лимфоцитов ПКЧ от времени инкубации в среде Эрла:

— — — в присутствии эрсела; — в отсутствие эрсела; 1, 1' — контрольные клетки «К»;

2, 2' — облученные клетки «О»; 3, 3' — клетки, облученные в присутствии эрсела «ОЭ»

Рис. 3. Хемилюминесценция лимфоцитов ПКЧ после введения в суспензию ионов кальция или Кон А:

1—3, 1'—3' — при введении кальция; 4—6, 4'—6' — при введении Кон А; — — — в присутствии эрсела;

— в отсутствие эрсела; 1, 1', 4, 4' — контрольные клетки «К»; 2, 2', 5, 5' — облученные клетки «О»; 3, 3', 6, 6' — клетки, облученные в присутствии эрсела «ОЭ»

по сравнению с клетками «К». На рис. 2 приведены данные о зависимости интенсивности ХЛ при адгезии через 5 мин после помещения клеток с люминолом в кювету от времени инкубации в среде Эрла в присутствии или в отсутствие эрсела. Данные для лимфоцитов, облученных в присутствии БСА, не приведены, так как они практически не отличались от результатов для клеток «О».

Более высокий уровень генерации АФК при адгезии клетками «О» и «ОЭ» по сравнению с контрольными, вероятно, обусловлен модификацией облучением состава и фазового состояния плазматических мембран лимфоцитов [9, 10], а следовательно, и продуктивности кислородоактивирующих систем. Инкубация лимфоцитов с эрселом для клеток «К» и «ОЭ» (рис. 2 1 и 3) первые два часа индуцирует уменьшение интенсивности ХЛ при адгезии, а при больших временах воздействия уровень генерации АФК выше, чем в суспензиях без эрсела. Для клеток «О» в присутствии эрсела интенсивность ХЛ выше в течение всего времени измерений.

Как известно [10, 12], воздействие облучения на клеточные мембраны в большой степени обусловлено накоплением продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), инициаторами которого являются АФК. Учитывая данные по воздействию эрсела на продукцию АФК, а также наблюдаемые различия между клетками «О» и «ОЭ», можно считать, что воздействие эрсела перед облучением уменьшает активность кис-

лородоктивирующих систем мембран, т. е. в определенной мере модифицирует реакции клетки на рентгеновское облучение. Этот вывод коррелирует с результатами работ о торможении известными радиопротекторами процессов перекисного окисления липидов [11], а также с данными работ [9, 12] о том, что исходное состояние облучаемого объекта определяет характер развития лучевого поражения. При внесении ионов кальция или Кон А в суспензию ХЛ-ответ лимфоцитов развивается на фоне предшествовавшего свечения клеток, и поэтому на рис. 3 представлены зависимости интенсивности ХЛ через 1 мин и через 5 мин после добавления кальция и Кон А соответственно относительно интенсивности ХЛ в момент внесения.

Видно, что облучение увеличивает амплитуду ХЛ-ответа клеток на кальций и Кон А по сравнению с контролем, что, вероятно, объясняется частичной радиационной деструкцией гликокаликса и обнажением более глубоко расположенных мембранных структур [9] ранее недоступных для взаимодействия с ионами кальция и молекулами Кон А.

Инкубация лимфоцитов с эрселом (рис. 3, 1'—6') также изменяет уровень генерации АФК при указанных воздействиях, а для клеток «ОЭ» наблюдается наибольший по интенсивности ХЛ ответ на введение кальция и Кон А.

Реакция клеток на Кон А в определенной степени является моделью специфического функционирования лимфоцитов в организме. Аналогично можно рассматривать и отклик лимфоцитов на введение ионов кальция, учитывая их важнейшую роль в процессах жизнедеятельности. С этой точки зрения, результаты, полученные для облученных клеток, позволяют объяснить данные литературы о стимулирующем воздействии введения облученной крови на целый ряд физиологических систем организма [1]. Результаты, зарегистрированные для клеток, облученных в присутствии эрсела, а также по воздействию эрсела на уровень генерации лимфоцитами АФК при адгезии, при введении в суспензию ионов кальция и Кон А, позволяют предположить, что в механизме действия биологического регулятора при лейкозе [5] и облучении существенную роль играет его влияние на кислородактивирующие системы плазматических мембран.

#### Список литературы

1. Несис А. И. // Облучение крови вне организма: Материалы II конф. по изол. облучению крови. М., 1980. С. 23.
2. Washida N., Sagawa A. and all // ВВА. 1980. V. 631. № 2. P. 371.
3. Семенкова Г. Н., Черенкевич С. Н. и др. // Иммунология. 1985. № 1. С. 79.
4. Семенкова Г. Н., Черенкевич С. Н. и др. // Биофизика. 1985. Т. 30. Вып. 5. С. 864.
5. Свирновский А. И. и др. Стволовые клетки и опухолевый рост. Киев, 1985. С. 51.
6. Говорун А. К. и др. // Биофизика. 1974. Т. 19. № 1. С. 100.
7. Дворецкий А. И. Система активного транспорта ионов при действии ионизирующей радиации на организм. Днепропетровск, 1986.
8. Мукалов И. О. и др. Теоретические и методические основы биохемилюм. М., 1986. С. 131.
9. Верболович В. П. и др. // Радиобиология. 1984. Т. 24. № 2. С. 227.
10. Попов Г. А. и др. // Радиация и организм. Обнинск, 1982. С. 37.
11. Попов Г. А. и др. // Радиобиология. 1984. Т. 24. № 3. С. 424.
12. Гончарова Е. Н., Кудряшов Ю. Б. Гипотеза эндогенного фона радиорезистентности. М., 1980.

УДК 581.2.07

Е. Н. ДЗЯТКОВСКАЯ

#### ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ МЕМБРАН РАСТЕНИЙ РЖИ, ЗАРАЖЕННЫХ СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНОЙ

В данной работе показаны результаты исследования особенностей организации пигментного аппарата фотосинтетических мембран в рас-