

ление и плотность пауков, можно учитывать роль *Th. impressum* в динамике численности популяций вредителей на II и III этапах защиты урожая [7], например, в посевах овса.

Список литературы

1. Принципы построения биологических основ борьбы с вредителями зерновых культур [Самерсов В. Ф., Яценя С. В., Александрович О. Р. и др.] — Минск, 1980.
2. Levi H. W. // *Bul. Amer. Mus. Natural History*. — 1957. — V. 112. — № 1. — P. 1.
3. Литвинова А. Н., Шляхтенко А. С., Овчаренко В. И. О фауне пауков (*Aranei*) Белоруссии / Ред. журн. «Весті АН БССР. Сер. біял. навук». — Минск. — Деп. в ВИНТИ 16.07.80, № 3114-80.
4. Luczak J. // *Pol. ecol. Stud.* — 1975. — Т. 1. — № 3. — S. 93.
5. Raatikainen M., Huhta V. // *An. zool. ienn.* — 1968. — V. 5. — № 3. — P. 254.
6. Булыгинская М. А., Калинин В. М. // *Энтомол. обозр.* — 1985. — Т. 64. — Вып. 3. — С. 441.
7. Самерсов В. Ф. Биологическое обоснование, разработка и внедрение комплексной системы защиты зерновых культур от вредителей в Белоруссии: Автореф. дис. ... д-р с.-х. наук. — Ленинград — Пушкин, 1983.

УДК 577.3.05 : 577.34

А. В. ТИМОШЕНКО, С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ, А. Б. САМАЛЬ

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КОНКАНАВАЛИН А-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ

Агглютинация лимфоцитов, индуцированная действием лектинов, является важным тестом функциональной активности клеток. Агглютинирующая способность клеток возрастает при опухолевой трансформации [1], но снижается при дифференцировке [2]. Явление агглютинации учитывают при культивировании клеток в присутствии митогенных лектинов [3]. Можно предположить, что образование межклеточных контактов необходимо для клеточной стимуляции, так как в условиях, исключающих взаимодействие клеток, ответа на митоген не наблюдали [4]. В этой связи актуальны вопросы о молекулярных механизмах митоген-индуцированной агглютинации клеток, установлении факторов, обеспечивающих регуляцию этого процесса.

Некоторые исследователи [5—9] предлагают рассматривать активные формы кислорода (АФК) — синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot -}$), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (OH) в качестве эндогенных медиаторов, участвующих в реализации раннего ответа клеток на стимулирующие воздействия. Действие АФК проявляется благодаря их высокой химической активности и способности модифицировать структурно-функциональные свойства клеток [10]. Ранее нами отмечено [8], что АФК принимают участие в процессах агглютинации и эндоцитоза поликлонального митогенного лектина конканавалина А (Кон А). В данной работе приведены результаты, позволяющие оценить вклад различных типов АФК в процесс Кон А-индуцированной агглютинации тимоцитов, полученные с использованием специфических перехватчиков АФК.

Материал и методика

Клетки выделяли из тимуса белых беспородных крыс, полученных из питомника лабораторных животных АМН СССР «Рапполово» (Ленинградская обл.), по стандартным методикам и суспендировали в фосфатном солевом буфере Дюльбекко, pH 7,3, содержащем CaCl_2 [3].

Скорость агглютинации тимоцитов оценивали по изменению светопропускания клеточной суспензии с использованием высокочувствительного лазерного нефелометра [11]. Измерения проводили в термостати-

руемой кварцевой кювете при 37 °С, концентрация клеток составляла $5 \cdot 10^6$ кл/мл. Скорость агглютинации характеризовали величиной изменения светопропускания суспензии через 5 мин после внесения Кон А (рис. 1) в концентрации 25 мкг/мл. Используемая доза Кон А обеспечивала достаточно высокую скорость агглютинации клеток и воспроизводимость измерений.

Для оценки влияния АФК на агглютинацию тимоциты преинкубировали с перехватчиками АФК или H_2O_2 в течение 5 мин перед добавлением Кон А.

В работе использовали Кон А, каталазу, маннит, супероксиддизмутаза, α -метил-D-маннозид (α -ММ) фирмы Sigma (США), L-триптофан фирмы Reanal (ВНР), пероксидазу фирмы Boehringer Mannheim (ФРГ), остальные реактивы отечественного производства квалификации «х. ч.».

Количественные данные, приведенные в работе, представляют среднее четырех — семи независимых экспериментов, выполненных с клетками, выделенными из различных животных. Достоверность различий средних оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 изображена типичная кривая изменения светопропускания суспензии от времени после добавления Кон А. Увеличение светопропускания клеточной суспензии связано с образованием клеточных агрегатов и уменьшением общей светорассеивающей поверхности клеток. При введении углеводного гаптена α -ММ наблюдается уменьшение светопропускания суспензии тимоцитов, связанное с разрушением клеточных агрегатов (см. рис. 1, кривая 3). В присутствии α -ММ Кон А агглютинацию клеток не вызывает (см. рис. 1, кривая 2). Контрольные эксперименты с использованием световой микроскопии показали наличие корреляции между образованием клеточных агрегатов и изменением светопропускания суспензии, свидетельствующей о применимости используемой методики для изучения процесса агглютинации тимоцитов.

Влияние перехватчиков АФК на КОН А-индуцированную агглютинацию тимоцитов крыс

Тип перехватчиков, концентрация	Скорость агглютинации, % от контроля
Перехватчики $\cdot OH$:	
этанол, 200 ммоль/л	54 ± 5
бензоат калия, 5 ммоль/л	56 ± 7
триптофан, 1 ммоль/л	84 ± 6
маннит, 25 ммоль/л	86 ± 4
тиомочевина, 20 ммоль/л	88 ± 4
Перехватчики $\cdot O_2$:	
1, 4-дiazобисцикло-2,2,2-октан, 2 ммоль/л	64 ± 4
азид натрия, 1 ммоль/л	76 ± 3
Перехватчики $O_2^{\cdot -}$:	
адреналин, 0,25 ммоль/л	$92 \pm 5^*$
супероксиддизмутаза, 25 мкг/мл	$90 \pm 4^*$
Перехватчики H_2O_2 :	
каталаза, 50 мкг/мл	195 ± 8
пероксидаза, 25 мкг/мл	310 ± 6

* Статистически недостоверные отклонения от контроля ($P > 0,05$).

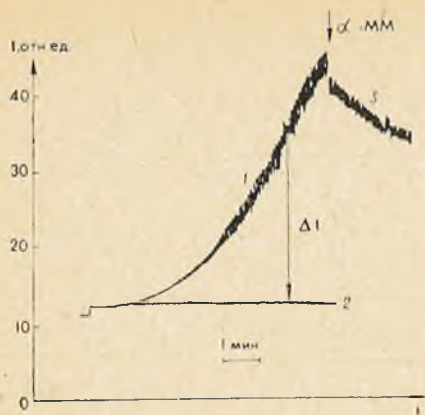


Рис. 1. Изменение светопропускания суспензии тимокитов крыс от времени после добавления Кон А в отсутствие (1) и присутствии (2) 0,1 моль/л α -ММ. Кривая 3 характеризует дезагрегацию клеток при добавлении 0,1 моль/л α -ММ. ΔI — величина изменения светопропускания суспензии, которую использовали для оценки скорости агглютинации клеток



Рис. 2. Влияние H_2O_2 на относительную скорость Кон А-индуцированной агглютинации тимокитов крыс:

1 — без добавок перехватчиков; 2 — в присутствии 5 ммоль/л бензоата калия; 3 — в присутствии 1 ммоль/л 1,4-дизазобисцикло-2,2,2-октана

В таблице представлены данные о влиянии перехватчиков АФК на Кон А-индуцированную агглютинацию тимокитов. Перехватчики $\cdot OH$ и 1O_2 вызвали достоверное ингибирование процесса агглютинации ($P < 0,05$). Однонаправленность ингибирующего действия этих перехватчиков говорит о том, что соответствующие АФК способствуют ускорению процесса агглютинации тимокитов. Влияние супероксиддизмутазы и ад- реналина, взаимодействующих с $O_2^{\cdot -}$, на агглютинацию незначительно (причем эффект статистически недостоверен для $P < 0,05$). По эффективности стимулирования процесса агглютинации рассмотренные АФК можно расположить в следующей последовательности: $\cdot OH \geq ^1O_2 > O_2^{\cdot -}$.

Каталаза и пероксидаза, утилизирующие H_2O_2 , приводят к значительному ускорению агглютинации клеток. При этом действие ферментов наблюдалось на любой стадии процесса агглютинации и зависело от их концентрации. Эти данные, однако, не позволяют сделать однозначного вывода о специфичности действия H_2O_2 на исследуемый процесс, так как не исключена возможность влияния на агглютинацию продуктов окисления, образующихся в ходе пероксидазных реакций и неспецифического взаимодействия ферментов с Кон А. Поэтому нами проведено изучение влияния экзогенной H_2O_2 на Кон А-индуцированную агглютинацию тимокитов.

Из рис. 2 видно (кривая 1), что эффект H_2O_2 не является однонаправленным: H_2O_2 в концентрациях 10^{-5} — 10^{-4} моль/л оказывает стимулирующее воздействие на агглютинацию, а при более высоких концентрациях вызывает ингибирование действия Кон А.

Характер зависимости скорости агглютинации тимокитов от концентрации H_2O_2 заслуживает отдельного рассмотрения. Ингибирование агглютинации при высоких концентрациях H_2O_2 связано, очевидно, с окислительным повреждением мембранных структур клеток, в частности сульфгидрильных групп, которые участвуют в реакциях агглютинации клеток [12]. В то же время H_2O_2 легко разлагается с образованием OH -радикала в реакциях с клеточными редуцентами [13] или металлами перемноженной валентности [14]. При этом появление $\cdot OH$ должно приводить, как следует из данных по действию перехватчиков АФК (см. таблицу), к ускорению процесса агглютинации. Для выявления эффекта $\cdot OH$ исследовано влияние на агглютинацию клеток бензоата калия — специфиче-

ского перехватчика $\cdot\text{OH}$ в клеточных системах [5], добавленного на фоне H_2O_2 . Из рис. 2 видно, что на кривой 2, характеризующей зависимость скорости агглютинации тимоцитов от концентрации H_2O_2 в присутствии бензоата, максимум проявляется значительно слабее, чем для контрольного образца клеток (кривая 1). 1, 4-Диазобисцикло-2, 2, 2-октан (перехватчик $^1\text{O}_2$) также вызывает снижение скорости агглютинации, но с сохранением выраженного максимума при концентрациях H_2O_2 10^{-5} — 10^{-4} моль/л (кривая 3).

Таким образом, ускорение агглютинации в присутствии относительно низких концентраций H_2O_2 связано преимущественно с действием $\cdot\text{OH}$, образующегося при разложении H_2O_2 в клеточной суспензии. При высоких концентрациях H_2O_2 (больших $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) эффект $\cdot\text{OH}$ исчезает, возможно, вследствие взаимодействия между H_2O_2 и $\cdot\text{OH}$ [14].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изменение уровня генерации АФК в клетках приводит к существенной модификации ответа тимоцитов крыс на Кон А. Так как появление АФК в клетках может быть объяснено функционированием трансмембранных электрон-транспортных редокс-цепей, обеспечивающих восстановление молекулярного кислорода, становится очевидным вовлечение редокс-процессов в регуляцию Кон А-индуцированной агглютинации лимфоцитов.

Список литературы

1. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д. Лектины.— Львов, 1981.
2. Метакровский Е. В. // Мол. биология.— 1981.— Т. 15.— Вып. 4.— С. 753.
3. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.— М., 1983.
4. Ситковский М. В. Молекулярные механизмы активации лимфоцитов. Биологическая химия (Итоги науки и техники).— М., 1979.— Т. 13.
5. Tauber A. I., Babior B. M. // J. Clin. Invest.— 1977.— V. 60.— № 2.— P. 374.
6. Hume D. A., Wroegemann K., Ferber E., Kolbuch-Braddon M. E., Taylor R. M. // Biochem. J.— 1981.— V. 198.— № 3.— P. 661.
7. Novogradsky A., Ravid A., Rubin A. L., Stenzel K. H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— V. 79.— № 4.— P. 1171.
8. Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н. // Цитология.— 1984.— Т. 26.— № 9.— С. 1083.
9. Семенкова Г. Н., Черенкевич С. Н., Левин В. И., Свирновский А. И. // Иммунология.— 1985.— № 1.— С. 79.
10. Kong S., Davison A. J. // Biochem. Biophys. Acta.— 1981.— V. 640.— № 1.— P. 313.
11. Самаль А. Б., Черенкевич С. Н., Хмара Н. Ф. // Проблемы гематол. и переливания крови.— 1982.— № 5.— С. 50.
12. Pfeifer R. W., Irons R. D. // Exp. Mol. Pathol.— 1981.— V. 35.— № 2.— P. 189.
13. Florence T. M. // J. Inorg. Biochem.— 1984.— V. 22.— № 4.— P. 221.
14. Азизова О. А., Осипов А. Н., Савов В. М., Зубарев В. Е., Каган В. Е., Владимиров Ю. А. // Биофизика.— 1984.— Т. 29.— Вып. 5.— С. 766.