

ДОКЛАДЫ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

АВТОРСКИЙ ОТТИСК

43-й ГОД ИЗДАНИЯ
Том 43, № 2
1999

УДК 577.15.087.5-07:276.535

М. Е. ХМАРА, В. Н. НИКАНДРОВ

**ОБРАЗОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ ЭНЗИМАТИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ КОМПЛЕКСОВ КАК НОВЫЙ
АСПЕКТ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТКИ**

(Представлено академиком С. В. Коневым)

Соотношение пролиферации и дифференциации клеток играет важную роль при воспалении, иммунном ответе, регенерации тканей, опухолевом росте. Пролиферация регулируется при участии систем циклических нуклеотидов; 2',5'-олигоаденилатов; белковых факторов роста, дифференциации и некроза различных клеток; ион-селективных (K^+ , Ca^{2+} и др.) каналов [1, 2].

Проведенные нами исследования особенностей репродукции вирусов в культурах животных клеток дают основания считать, что кроме перечисленных механизмов может существовать, по меньшей мере, еще один. В настоящей работе предпринята попытка сформулировать этот механизм на основе анализа собственных экспериментальных данных [3—8].

Кратко совокупность этих фактов состоит в следующем.

1. Добавка панкреатической РНК-азы (ЕС 3.1.27.5) к суспензии инфицированных вирусом венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ), а также оспы или простого герпеса, но не гриппа, фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) и последующая термическая обработка (кипячение) смеси приводит к появлению в супернатанте белковых комплексов молекулярной массы 97 кДа.

2. Комплексы формируются без участия прочных химических связей типа ковалентных, согласно данным гель-хроматографии, в 1 М растворе NaCl они диссоциируют на три компонента: 68 кДа, 15,8 и 13,8 кДа. При электрофорезе в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях обнаруживаются, однако, лишь два компонента: 68 и 13,8 кДа.

3. Комплексы обладают РНК-азной и значительной пероксидазной активностью. РНК-азная активность их практически одинакова с активностью исходной нуклеазы. Комплексы стабильны при 95 °С и рН 2,0 на протяжении 45 мин. Эти олигомерные энзиматически активные комплексы (ОЭК) не образуются при рН > 7,2.

4. ОЭК не обнаружены при добавках РНК-азы к неинфицированным вирусом клеткам и последующей термической обработке. В этом случае в супернатанте присутствуют отдельно компоненты 68 и 13,8 кДа. Не исключено, однако, что комплексы могут формироваться, но в этом случае они нестабильны и легко распадаются. Комплексы не образуются при добавках РНК-азы к очищенному вирусу в отсутствие клеточной суспензии.

5. В отличие от отдельных компонентов ОЭК обладает уникальным свойством — антивирусным действием по отношению к вирусам ВЭЛ, оспы, простого герпеса. В присутствии комплекса клетки не погибают при заражении вирусом, даже в дозе $10^6 LD_{50}$. Это фактически превосходит эффект всех известных антивирусных соединений. Данное свойство исчезает после обработки ОЭК трипсином.

6. ФЭК после обработки их ОЭК пригодны в качестве клеточной модели хронических вирусных инфекций. Заражение таких клеток вирусами ВЭЛ или герпеса приводит к сохранению в них жизнеспособных инфекционных частиц практически при отсутствии цитопатического эффекта.

7. Сопоставление действия ОЭК и нативной РНК-азы на два близких типа клеток — фибробласты мышей линии L₉₂₉ и ФЭК позволяет выявить следующие различия (таблица). Принципиальным отличием клеток L₉₂₉ является исходная контаминация их онкорнавируса-

65% меньшая, чем нативной РНК-азы, тогда как активность ОЭК сопоставима с последней [3]. РНК-азная активность ОЭК более чувствительна к трипсину в сравнении с нативной нуклеазой. По-видимому, ОЭК является продуктом взаимодействия структурно модифицированных и РНК-азы, и белка 68 кДа. Такая модификация происходит лишь при инфицировании клеток вирусами (в данной конкретной ситуации, но не только при нем) и является свидетельством экстремальности ситуации. В интактных, не содержащих персистирующих вирусов клетках подобных молекул нет. В то же время как явствует из анализа данных таблицы, появление ОЭК вполне вероятно при вирусной контаминации. Уяснение характера изменений молекулы РНК-азы требует проведения специальных исследований и является самостоятельной задачей. Однако поскольку ОЭК, судя по данным ИК-спектроскопии, характерен высоким содержанием метильных групп: их уровень увеличивается в 7 раз по сравнению с белками интактных клеток [4], можно думать, что одним из путей модификации молекул белков может быть метилирование.

Однако модифицированная РНК-аза недостаточна для реализации протекторного действия. Для этого необходим комплекс с компонентом 68 кДа. Наличие значительной пероксидазной активности у ОЭК [8] позволяет предположить если не идентичность указанного компонента тканевым пероксидазам, то, во всяком случае, присутствие в его молекуле металлсодержащего центра. Интерпретация ОЭК как носителя пероксидазной и РНК-азной активностей заманчива по следующим причинам. Считают, что H_2O_2 участвует в регуляции деления клеток из-за способности перекиси и свободных радикалов кислорода активировать гуанилатциклазу [9]. В итоге в тканях растет уровень циклического гуанозинмонофосфата, усиливающего пролиферативные процессы. Пероксидазный путь разложения H_2O_2 как раз ведет к образованию активных форм кислорода, и его реализация может способствовать активации гуанилатциклазы. Действие же РНК-азы на функционально-метаболические процессы клетки, как полагают, опосредуется клеточной мембраной [10]. Возможно, на последней существуют РНК-азочувствительные центры.

Непермиссивность фибробластов L_{929} для ряда вирусов вследствие исходной контаминации клеток онкорнавирусами, идентичность воздействия ОЭК и нативной РНК-азы на уровень биосинтеза РНК в нативных L_{929} наводят на мысль о возможном образовании ОЭК непосредственно в подобных клетках. Нами получено косвенное подтверждение такой возможности: в водно-солевом растворе белки разной функциональной специфики формируют устойчивые эквимольные комплексы, например «плазминоген—пируваткиназа» [11]. Биологическая активность последних — предмет дальнейших исследований.

Таким образом, при действии повреждающих факторов (вирусной инфекции и, по-видимому, ряда других) клетки формируют ОЭК с необычной биологической активностью: они защищают клетки от более сильных повреждающих факторов, т. е. в известном смысле делают ее иммортабельной. Усиление синтеза РНК в клетках при добавках ОЭК хорошо согласуется с увеличением пролиферативных тенденций клеток [4]. Иммортабельные клетки способны к неограниченному делению, они — первый шаг к малигнизации ткани [12]. Как видно из материалов таблицы, ускорение синтеза РНК в L_{929} при добавке ОЭК сопровождается снижением синтеза ДНК. Эта картина очень напоминает парадоксальную стадию канцерогенеза [12]. Примечательно, что опухолевые клетки линий HeLa и Нер отвечают на обработку ОЭК так же, как L_{929} : синтез РНК в них возрастает на 180—200% [6]. Исходя из изложенного, мы полагаем, что появление ОЭК в клетках может быть одним из важных (обязательным, но не единственным) начальных этапов малигнизации клеток. Детальное раскрытие сущности этого механизма является предметом дальнейшего углубленного изучения.

Summary

It is supposed that oligomeric protein complexes displaying RNAase and peroxidase activities, are induced in cells by damaging factors. These complexes protect cells from stronger damaging factors and, perhaps, they are one of essential (but not the sole) stages of tissue malignation.

Литература

1. Епифанов О. И., Полуновский В. А., Терских В. В. // Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии. М., 1988. Т. 11.
2. Северин Е. С. Избирательная регуляция клеточного метаболизма / 45-е Баховское чтение. М., 1991.
3. Votyakov V. I., Khmara M. E., Akhrem A. A., Mогоz S. G. // Contr. Oncol. Basel, 1984. Vol. 20. P. 176—184.

4. Хмара М. Е. Антивирусные и физико-химические свойства макромолекулярного комплекса, получаемого с помощью панкреатической рибонуклеазы из лизата инфицированных клеток: Дис. ... канд. мед. наук. Мн., 1985.
5. Ахрем А. А., Мороз С. Г., Вотяков В. И. и др. // V Всесоюзн. биохим. съезд. Тез. стендов. сообщений. М., 1986. Т. 2. С. 248—249.
6. Хмара М. Е. // Русский журн. ВИЧ/СПИД и родственные проблемы. 1997. Т. 1, № 1. С. 159.
7. Вотяков В. И., Хмара М. Е., Изергина Э. А., Квачева З. Б. // Методические проблемы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций. Мн., 1980. С. 78—86.
8. Хмара И. М., Хмара М. Е., Никандров В. Н. // Материалы IV Международн. конф. «Чернобыльская катастрофа: прогноз, профилактика, лечение и медико-психологическая реабилитация пострадавших». Мн., 1995. С. 153.
9. Бижурин И. М., Панов М. А. // Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии. М., 1986. Т. 3.
10. Куриненко Б. М. Механизм биологического действия РНК-азы *Vacc. intermedius* и возможные области ее практического применения: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1988.
11. Никандров В. Н., Мурашко О. Н., Воробьева Г. В. и др. // Докл. АН Беларуси. 1997. Т. 41, № 3. С. 69—75.
12. Балаж А. Биология опухолей. Сомнения и надежды. М., 1987.

*Белорусский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь*

Поступило 05.03.98