

биологическим, идентичный стандарт, наличие значительных эритроцитами,

впрыски глюкозой, определяемого в плазме крови увеличением количества, снизив, допустив, в комплексе, и только полное изучение до и после

десяти клинически, и трижды от, ЦЛС-3 при $t = -20^\circ\text{C}$, а из в изотоническом, или в течение, мола [2]. О инсулин в эритро-

сефадексом G-50, Собирали фракции раствором, скоростью 0,5 мл/мин. экстракции — 3,5 мл. анализа (РИА) введение пробы

инсулинсодержащий, после экстракции этанолом ($10 \pm$), значительно, гель-фильтрация, ответ на возмущения, масса ин- радиоиммунно, распада, низкой ион- после нагруз- основном в

Биологический смысл подобного явления, вероятно, может заключаться в том, что комплексообразование гормона играет буферно-резервирующую роль по отношению к свободному инсулину плазмы крови. Комплекс, вероятно, может распадаться под воздействием регуляторных факторов или по мере утилизации свободного инсулина.

Радиоиммунологическое определение инсулина в гемолизате и экстрактах эритроцитов

Среда определения	До гель-фильтрации, пмоль/л	После гель-фильтрации, пмоль/л
Гемолизат эритроцитов	7040 ± 359	—
Экстракт с глюкозой	804 ± 107	3455 ± 215
Экстракт с этанолом	388 ± 57	3232 ± 309

Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют утверждать, что радиоиммунный анализ отражает истинное количество ИРИ в эритроцитах, и что инсулин из эритроцитарного депо высвобождается, в основном, в связанном виде.

Список литературы

1. Кузнецов С. А., Сандуляк Л. И., Халаим Е. А. Свойства инсулина, депонированного в эритроцитах человека. — Докл. АН УССР. Сер. Б, 1981, № 9, с. 65—67.
2. А. с. № 1131507 (СССР). Способ получения инсулина / С. А. Кузнецов, Е. А. Халаим. — Оpubл. в Б. И., 1984, № 48.
3. Никитин В. Н., Маковоз Р. К., Гринченко Е. С. и др. Иммунореактивный инсулин крови и поджелудочной железы белых крыс разного возраста в норме и при пролонгировании жизни. — В кн.: Актуальные проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики. Киев, 1979, с. 223—230.
4. Сандуляк Л. И. Эритроциты как депо и система транспорта инсулина. — Докл. АН СССР, 1974, 213, № 4, с. 1020—1021.
5. Сандуляк Л. И. Эритроциты как депо и система транспорта инсулина: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1983. — 46 с.

Черновик ун-т

Поступила 05.06.84

УДК 612.017.1—547.962.2—616—097

Р. А. Банникова

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ОСНОВНЫХ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ГЕТЕРОАНТИГЕНЫ КОЖИ

Известно, что развитие и выражение иммунного ответа находятся под генетическим контролем. И, хотя участие основных ядерных белков (гистонов) в регуляции активности генов доказано как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции [9], общая схема, объясняющая механизм регуляции, не создана. В связи с отсутствием у гистонов достаточной специфичности выдвинуты предположения, что они участвуют в регуляции совместно с другими макромолекулами — РНК, негистоновыми белками [2]. Данные литературы последних лет свидетельствуют как об изменении функциональной активности генетического материала, так и о качественных и количественных изменениях нуклеиновых кислот лимфоидных клеток в условиях формирования иммунного ответа и иммунологической памяти на гетеро и аллоантигены [1]. Возникает вопрос, как изменяется спектр гистонов лимфоидных клеток при гетеросенсибилизации.

Методика

Исследования проведены на 69 кроликах массой 1,5—2 кг. Эффект первичной гетеросенсибилизации достигался внутрибрюшинным введением 30 мг водорастворимого крысиного кожного антигена, полученного с учетом рекомендаций [6], вторичной гетеросенсибилизации — повторным введением его с интервалом 7 сут после первой инъекции. Выделение гистонов из лимфоцитов лимфоузлов и режим их электрофоретического разделения нами описан ранее [3]. Электрофоретический спектр гистонов изучали у пяти групп животных (1 контрольной и 4 опытных): I — интактные животные; II — при формировании первичного иммунного ответа к гетероантигену на 3 сут; III — на 7 сут; IV — при формировании вторичного иммунного ответа к гетероантигену на 1 сут; V — на 5 сут.

Электрофореграммы обрабатывали на денситометре типа «Хромоскан 200/201» (Англия). Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью непараметрического критерия U [7].

Результаты и их обсуждение

Анализ количественных соотношений отдельных фракций гистонов, выделенных из лимфоцитов лимфоузлов интактных животных и животных на фоне различных сроков первичной гетеросенсибилизации кожным антигеном, выявил тенденцию к статистически достоверному увеличению фракции H1 до 23,2 % с удлинением срока гетеросенсибилизации до 7 сут ($p < 0,05$, табл. 1). При этом соответственно уменьшается доля совместно идущих фракций H3 и H2B до 42,6 % по сравнению с контролем (50 %). Фракции H2A и H4 претерпевают незначительные изменения.

Таблица 1. Процентное соотношение гистоновых фракций при формировании I и II иммунного ответа в условиях гетеросенсибилизации

Серия опыта	Количество животных	Статистический показатель	H1	H3+H2B	H2A	H4
Интактные животные	12	M	12,9	50,0	26,6	12,5
		Предел колебаний	11,6—14,2	42,4—57,5	21,0—30,4	11,0—14,1
3 сут (первичный иммунный ответ)	14	M	11,6	54,8	22,1	11,5
		Предел колебаний	10,1—13,0	50,1—58,3	20,3—26,4	10,4—12,6
		p_1	$<0,05$	42,6	$<0,05$	$<0,05$
7 сут (первичный иммунный ответ)	15	M	23,2	$<0,05$	23,0	11,2
		Предел колебаний	21,0—26,4	40,1—45,1	20,8—26,8	10,9—13,0
		p_1	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$
		p_2	$<0,05$	$<0,05$	$>0,05$	$>0,05$
1 сут (вторичный иммунный ответ)	15	M	25,1	42,3	22,1	10,5
		Предел колебаний	23,1—27,9	40,3—45,5	19,8—24,1	9,9—11,7
		p_1	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$
		p_2	$<0,05$	$<0,05$	$>0,05$	$<0,05$
		p_3	$<0,05$	$<0,05$	$=0,05$	$<0,05$
5 сут (вторичный иммунный ответ)	13	M	14,6	51,9	22,5	11,0
		Предел колебаний	12,7—16,2	48,5—54,1	20,5—24,2	10,1—12,5
		p_1	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$
		p_2	$<0,05$	$<0,05$	$>0,05$	$>0,05$
		p_3	$<0,05$	$<0,05$	$=0,05$	$>0,05$
		p_4	$<0,05$	$<0,05$	$>0,05$	$>0,05$

Согласно количественной характеристике отдельных фракций в составе суммарных гистонов, выделенных из лимфоцитов лимфоузлов животных на 3 сут формирования первичной гетеросенсибилизации, все фракции практически остаются без изменений по сравнению с контролем.

Результаты электрофоретического разделения суммарного гистона на 7 сут гетеросенсибилизации свидетельствуют о росте фракции H1, отличающейся не только в количественном отношении от аналогичной

Таблица 2. Динамика относительной электрофоретической подвижности фракций гистонов при формировании I и II иммунного ответа на гетероантиген

Серия опыта	Количество животных	Статистический показатель	H1	H3	H2B	H2A	H4
Интактные животные	12	M	0,30	0,52	0,65	0,75	0,80
		Предел колебаний	0,27—0,34	0,48—0,55	0,60—0,68	0,71—0,79	0,70—0,83
3 сут (первичный)	14	M					

т первичной ге-
дорастворимого
вторичной гете-
первой инъек-
рофоретическо-
онов изучали у
животные; II —
3 сут; III — на
ероантигену на

оскан 200/201»
помощью непа-

ий гистонов,
ых и живот-
изации кож-
ному увели-
сбилизации
шается доля
нию с конт-
льные изме-

рмировании I

	H4
6	12,5
30,4	11,0—14,1
1	11,5
26,4	10,4—12,6
05	<0,05
0	11,2
26,8	10,9—13,0
05	<0,05
05	>0,05
1	10,5
24,1	9,9—11,7
05	<0,05
05	<0,05
05	<0,05
5	11,0
24,2	10,1—12,5
05	<0,05
05	>0,05
05	>0,05
05	>0,05

кций в сос-
оузлов жи-
изации, все
ию с конт-

ого гистона
ракции H1,
аналогичной

Таблица 2. Динамика относительной электрофоретической подвижности фракций гистонов при формировании I и II иммунного ответа на гетероантиген

Серия опыта	Количество животных	Статистический показатель	H1	H3	H2B	H2A	H4
Интактные животные	12	M	0,30 0,27—0,34	0,52 0,48—0,55	0,65 0,60—0,68	0,75 0,71—0,79	0,80 0,70—0,83
3 сут (первичный иммунный ответ)	14	M	0,34 0,31—0,38	0,53 0,50—0,57	0,68 0,65—0,71	0,75 0,71—0,78	0,80 0,78—0,82
		p ₁	<0,05	=0,05	=0,05	>0,05	>0,05
7 сут (первичный иммунный ответ)	15	M	0,37 0,35—0,39	0,55 0,52—0,57	0,65 0,62—0,68	0,78 0,75—0,80	0,81 0,79—0,82
		p ₁	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
		p ₂	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
1 сут (вторичный иммунный ответ)	15	M	0,40 0,37—0,42	0,56 0,52—0,58	0,68 0,65—0,70	0,77 0,74—0,79	0,82 0,80—0,85
		p ₁	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
		p ₂	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
		p ₃	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	=0,05
5 сут (вторичный иммунный ответ)	13	M	0,37 0,35—0,40	0,55 0,52—0,59	0,66 0,64—0,69	0,76 0,73—0,79	0,81 0,79—0,85
		p ₁	<0,05	<0,05	=0,05	=0,05	=0,05
		p ₂	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05
		p ₃	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
		p ₄	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05

фракции в контроле и серии на фоне 3 сут гетеросенсибилизации как отмечалось выше, но и в качественном отношении — появлением гетерогенности (разделением на две подфракции, табл. 2).

Этот количественный рост фракции Н1, сопровождающийся тенденцией к разделению на подфракции с удлинением срока первичной гетеросенсибилизации до 7 сут, вероятно, является следствием интенсификации синтеза клеточных белков в условиях усиления пролиферации лимфоидных клеток под влиянием антигенной стимуляции.

Формирование вторичного иммунного ответа к гетероантигенам кожи на 1 сут сопровождается значительным ростом фракции гистона Н1. Так, если в контроле доля фракции Н1 составляет 12,9 %, то на 1 сут формирования вторичного иммунного ответа — 25,1 % (табл. 1). В качественном отношении фракция Н1 отличается от остальных гистоновых фракций тенденцией к разделению на две-три подфракции (табл. 2). Фракции Н3+Н2В, Н2А и Н4 меняются незначительно.

В электрофоретическом спектре суммарного гистона, выделенного из лимфоцитов лимфоузлов животных на 5 сут формирования вторичной гетеросенсибилизации, доля фракции Н1 составляет 14,6 %, что значительно ниже цифр, полученных на 1 сут (25,1 %), однако несколько выше контрольных показателей.

При сравнении количественных соотношений отдельных фракций в составе суммарных гистонов в условиях формирования первичного и вторичного иммунного ответа к гетероантигенам кожи установлено, что наибольший рост фракции Н1 отмечается на 1 сут формирования вторичного иммунного ответа (25,1 %) в отличие от 3 (11,6 %) и 7 (23,2 %) суток первичного иммунного ответа, а также 5 сут (14,6 %) вторичного иммунного ответа.

Относительная электрофоретическая подвижность (О. Э. П.) фракции Н1, отличаясь от остальных гистоновых фракций медлительностью, тем не менее в условиях гетеросенсибилизации подвержена изменению. Если у интактных животных О. Э. П. (в см) фракции Н1 равна 0,30, то формирование первичной гетеросенсибилизации сопровождается ее ростом до 0,34 (на 3 сут) и 0,37 (на 7 сут). Значительного увеличения до 0,40 достигает О. Э. П. фракции Н1 на 1 сут в условиях формирования вторичного иммунного ответа. На 5 сут вторичной гетеросенсибилизации О. Э. П. фракции Н1 составляет 0,37. Подвижность остальных гистоновых фракций варьирует очень незначительно независимо от серии исследования.

Поскольку фонд гистонов в клетке невелик, а скорость распада не связанных с хроматином гистонов высока, то вполне естественно, что процессы синтеза и распада не могут изменить существенно как общее содержание гистонов в ядре на единицу ДНК, так и их относительное содержание в ядре [5]. Исключением является гистон Н1. Его синтез осуществляется с наибольшей скоростью по сравнению с другими гистонами.

Формирование иммунного ответа в условиях антигенного раздражения характеризуется не только сложными неспецифическими процессами перестройки во всем организме, но и изменением уровня содержания циклических нуклеотидов в клетках лимфоидных органов [4]. Как было установлено, при воздействии антигена на В-клетку в последней повышается уровень цАМФ [12], а гуморальные факторы, вырабатываемые активированными антигеном Т-клетками хелперами, способны вызывать увеличение содержания цГМФ в клетке [11]. Циклонуклеотиды посредством активирования протеинкиназ осуществляют фосфатную модификацию различных белков, в том числе белков ферментов, а также гистоновых и негистоновых белков хроматина [10]. Образование же фосфоформ гистонов значительно ослабляет взаимодействие между катионными и анионными участками хроматина [8].

Можно с достаточным основанием предположить, что под влиянием трансплантационных гетероантигенов кожи на фоне активной пролиферации лимфоидных клеток в ядрах лимфоцитов осуществляется уси-

ленное фосфорилирование (на Н1).

Таким образом, формирование вторичной гетеросенсибилизации фракции Н1, с одной стороны, и вторичной гетеросенсибилизации модификации — фосфорилирования на 1 сут вторичной гетеросенсибилизации, полученными в серии экспериментов, указывают на определенность механизма, при котором происходит контакт с антигеном.

1. Удлинение срока формирования иммунного ответа до 7 сут приводит к изменению ядерных белков.

2. Формирование иммунного ответа уже в более ранние сроки сопровождается изменением ядерных белков.

3. Основные изменения в формировании иммунного ответа при вторичной гетеросенсибилизации.

1. Антоненко В. Т. Сенсибилизация в патологии. — В кн. *Сенсибилизация в патологии*. — В кн. Наук. думка, 1981, с. 102—103.
2. Балаж А., Блажек Л. *Иммунитет*. — 1982. — 304 с.
3. Банникова Р. А. Иммуногенез. — В кн. *Иммуногенез*. — М.: Медицина, 1982, с. 411—415.
4. Белозоров А. П., Вавилова Л. П. Молекулярная биология. — М.: Наука, 1982, с. 102—103.
5. Бойко П. Я., Сидорова Л. П. Теория гистонов. — М.: Наука, 1983, 48, вып. 1, с. 23.
6. Вязов О. Е., Ходжаев С. М. Водство по иммунологии. — М.: Медицина, 1982, с. 102—103.
7. Гублер Е. В., Генкин Л. П. Медико-биологические аспекты адаптации организма. — М.: Медицина, 1982, с. 102—103.
8. Дорофеев Г. И., Косов С. П. Адаптация организма. — М.: Медицина, 1982, с. 102—103.
9. Клейнсмидт Л., Стейнберг М. Молекулы и функции. — М.: Медицина, 1982, с. 102—103.
10. Северин Е. С., Ткаченко В. П. Сульфат аденозина. — М.: Биохимия, 1982, с. 102—103.
11. Hadden J. W., Hadden J. W. Possible intracellular. — Acad. Sci. USA, 1972, 69, 102—103.
12. Watson J. The influenza virus. — p. 97—111.

Киев. ин-т усовершенствования врачей.

ленное фосфорилирование ядерных белков (и, в первую очередь, гистона Н1).

Таким образом, выявленный нами рост фракции Н1 на 7 сут первичной гетеросенсибилизации и значительно более выраженное увеличение фракции Н1, сопровождающееся его гетерогенностью, на 1 сут вторичной гетеросенсибилизации — результат специфической химической модификации — фосфорилирования. Значительный рост фракции Н1 на 1 сут вторичной гетеросенсибилизации, превалирующий над данными, полученными в сериях исследований, направленных на изучение закономерностей формирования первичного иммунного ответа к гетероантигенам кожи, указывает на существование иммунологической памяти — механизма, при помощи которого организм запоминает предшествующий контакт с антигеном.

Выводы

1. Удлинение срока первичной гетеросенсибилизации организма до 7 сут приводит к некоторой перестройке фракционного состава основных ядерных белков (гистонов), проявляющейся в росте фракции Н1.

2. Формирование вторичного иммунного ответа на гетероантиген уже в более ранние сроки (1 сут) в отличие от первичного иммунного ответа сопровождается ростом фракции Н1.

3. Основные ядерные белки (гистоны) принимают участие в механизме формирования иммунного ответа как на первичный, так и на вторичный гетерогенный стимул.

Список литературы

1. Антоненко В. Т. Современные вопросы проблемы иммунологической реактивности в патологии. — В кн.: Актуальные проблемы современной патофизиологии. Киев: Наук. думка, 1981, с. 14—16.
2. Балаж А., Блажек И. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации. — М.: Мир, 1982.—304 с.
3. Банникова Р. А. Изменение спектра основных ядерных белков лимфоцитов при формировании иммунного ответа на аллоантигены кожи. — Физиол. журн., 1983, 29, № 4, с. 411—415.
4. Белозоров А. П., Васильченко В. Н. Циклические нуклеотиды и иммунный ответ. — Молекуляр. биология, 1974, вып. 16, с. 34—46.
5. Бойко П. Я., Сидоренко Л. И., Шевченко Н. А. и др. Активация хроматина и протеолиза гистонов при подавлении синтеза белков в клетках печени. — Биохимия, 1983, 48, вып. 1, с. 23—32.
6. Вязов О. Е., Ходжаев Ш. Х. Приготовление тканевых экстрактов. — В кн.: Руководство по иммунологии. М.: Медицина, 1973, с. 168—170.
7. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973.—141 с.
8. Дорофеев Г. И., Кожемякин Л. А., Ивашкин Т. И. Циклические нуклеотиды и адаптация организма. — Л.: Наука, 1978.—203 с.
9. Клейнсмидт Л., Стейн Г., Стейн Дж. Хромосомные белки и регуляция активности генов. — Молекулы и клетки, 1977, вып. 6, с. 45—65.
10. Северин Е. С., Ткачук В. А., Гуляев Н. Н. Взаимодействие аденозин-3-5 цикло-сульфата с аденозин-3', 5'-циклофосфат-зависимой протеинкиназой и фосфодиэстеразой. — Биохимия, 1976, 41, № 6, с. 384—387.
11. Hadden J. W., Hadden E. M., Hadlox M. K. Guanosine 3, 5 cyclic monophosphates a possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, p. 3024—3033.
12. Watson J. The influence of intracellular levels of cyclic nucleotides on cell proliferation and the induction of antibody synthesis. — J. Exp. Med., 1975, 141, N 1, p. 97—111.

Киев. ин-т усовершенствования врачей

Поступила 16.03.84