

А. К. Гулевский, Ю. С. Ахатова, А. А. Сысоев, И. В. Сысоева

Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции кордовой крови на энергетический обмен в лейкоцитах

(Представлено академиком НАН Украины А. Н. Гольцевым)

Методом хемоллюминесцентного анализа определено содержание АТФ, АДФ и АМФ в клетках лейкоконцентрата, подвергнутых инкубации в среде, содержащей низкомолекулярную (до 5 кДа) фракцию кордовой крови (0,15 мг/мл). Установлено, что данная фракция значительно стимулирует накопление АТФ и АДФ и не влияет на содержание АМФ. Стимулирующий эффект низкомолекулярной фракции кордовой крови блокировался ингибитором гликолиза, йодоацетатом Na и ингибитором транспорта глюкозы, цитозалазином В. Показано, что низкомолекулярная фракция из кордовой крови способствует увеличению аденилатного пула лейкоцитов. Также экспериментально установлено, что присутствие в инкубационной среде низкомолекулярной фракции кордовой крови способствует накоплению глюкозы клетками лейкоконцентрата.

Ранее было установлено, что включение в среду инкубации нативных или криоконсервированных лейкоцитов низкомолекулярной фракции кордовой крови (ФКК) (ММ до 5 кДа) или препарата Актовегин (ММ до 5 кДа) способствует увеличению их фагоцитарной активности [1, 2].

В качестве возможного механизма этого феномена было выдвинуто предположение о стимуляции транспорта глюкозы и активации процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования в митохондриях лейкоцитов, что, в конечном счете, приводит к накоплению макроэргических соединений в виде АТФ. Относительно препарата Актовегин, который, как и ФКК, получают из криогемолизата крови молодых животных (2–3 мес.), существуют данные о его стимулирующем действии на транспорт глюкозы в клетки и тканевое дыхание [3]. Вместе с тем информация о влиянии ФКК на энергетический обмен в лейкоцитах в качестве возможного механизма ее стимулирующего действия на функциональную активность иммунных клеток крови отсутствует. Это и определило цель нашего исследования, которое заключалось в изучении влияния ФКК на накопление глюкозы и содержание аденилатов в лейкоцитах.

Материалы и методы исследования. Концентрат лейкоцитов из донорской крови человека получали методом ускоренного осаждения эритроцитов декстраном [4]. Фракцию с компонентами (ММ до 5 кДа) из цельной кордовой крови крупного рогатого скота выделяли методом ультрафильтрации [5] с использованием мембранного модуля фирмы “Sartorius” (Германия). Затем ФКК лиофилизировали [6] и хранили при -80°C . В среду инкубации лейкоцитов ФКК вносили в количестве 0,15 мг/мл.

Содержание АТФ, АДФ и АМФ в лейкоцитах определяли методом хемоллюминесцентного анализа с помощью АТР-Luminometer (LKB-1250, Швеция) после инкубации клеток в среде с ФКК (0,15 мг/мл) в течение 20 мин при 37°C . В ходе исследования были использо-

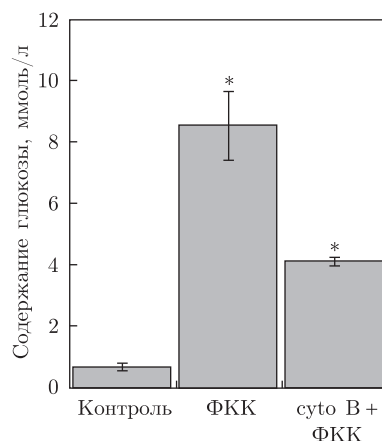


Рис. 1. Влияние ФКК на содержание глюкозы в лейкоцитах ($n = 4$); cyto B — цитохалазин В.

* — Отличия статистически значимы относительно контрольных значений ($p < 0,05$)

ваны ингибитор гликолиза йодоацетат натрия (в среду инкубации вносили в конечной концентрации 1 ммоль/л) и ингибитор транспортера глюкозы GLUT-1 цитохалазин В (в среду инкубации вносили в конечной концентрации 10 мкмоль/л) [7, 8]. Общий пул аденилатов рассчитывали путем определения суммы АТФ, АДФ и АМФ. Количество повторяемых экспериментов равно 5.

Для определения содержания глюкозы лейкоциты донорской крови ($2 \cdot 10^7$ кл/мл) предварительно инкубировали 15 мин при 37 °С в глюкозосодержащей среде (20 ммоль/л) с добавлением ФКК (0,15 мг/мл). С целью ингибирования транспортера глюкозы GLUT-1 в суспензию лейкоцитов вносили цитохалазин В (10 мкмоль/л). Далее клетки помещали в безглюкозную среду с помощью гель-фильтрации, добавляли 1%-й раствор тритона X-100 и определяли содержание глюкозы глюкозооксидазным методом. Количество повторяемых экспериментов равно 6.

Результаты и их обсуждение. Известно, что основным энергетическим субстратом для большинства типов лейкоцитов является глюкоза, которая транспортируется в клетку с помощью транспортеров глюкозы семейства GLUT [9–11]. Поэтому при изучении механизма действия ФКК на функциональную активность лейкоцитов в первую очередь было исследовано ее влияние на накопление глюкозы в лейкоцитах. При этом был использован ингибитор одного из основных для данного типа клеток транспортеров глюкозы GLUT-1 — цитохалазин В (10 мкмоль/л) [11].

Результаты первой серии исследования позволили установить, что процесс накопления глюкозы стимулируется фракцией кордовой крови при оптимальной ее концентрации (0,15 мг/мл) [1, 2] в среднем в 3,76 раза (рис. 1).

Добавление в среду инкубации цитохалазина В подавляло стимулированное ФКК накопление глюкозы в лейкоцитах. Это свидетельствует о том, что низкомолекулярные компоненты ФКК способствуют увеличению притока основного для данного типа клеток энергетического субстрата путем воздействия на GLUT-1.

Следует отметить, что все важнейшие реакции лейкоцитов, такие как хемотаксис, образование фагосом, поглощение и переваривание инородных частиц, секреторная дегрануляция, синтез интерлейкинов, антител и интерферона, являются энергозависимыми и требуют производства большого количества макроэргических соединений. В связи с этим, во вто-

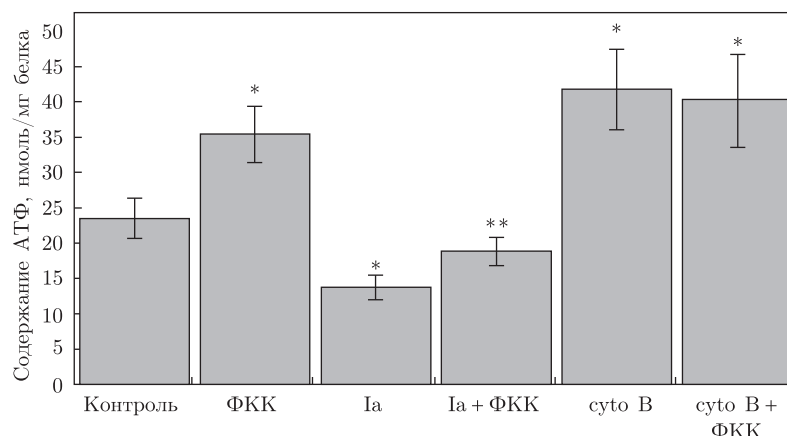


Рис. 2. Влияние ФКК на содержание АТФ в лейкоцитах ($n = 5$): Ia — йодоацетат натрия; cyto B — цитохалазин В.

Здесь и на рис. 3: * — отличия статистически значимы относительно контрольных значений ($p < 0,05$); ** — отличия достоверны относительно варианта инкубации лейкоцитов с добавлением йодоацетата натрия ($p < 0,05$)

рой серии экспериментов было исследовано влияние ФКК на аденилатную энергетическую систему лейкоцитов, а именно, на содержание АТФ, АДФ и АМФ.

Результаты, полученные нами, показали, что содержание АТФ в исследуемых клетках после их инкубации в среде с ФКК достоверно увеличивалось по сравнению с контролем и составляло $(35,42 \pm 3,91)$ и $(23,42 \pm 2,9)$ нмоль/мг белка соответственно (рис. 2).

В связи с тем, что основным источником получения энергии для большинства клеток лейкоцитарного ряда является гликолиз [10], для более детального исследования механизма действия ФКК был проведен ингибиторный анализ с использованием ингибитора гликолиза йодоацетата натрия. Действие последнего связано с блокированием одного из ключевых ферментов гликолиза — глицероальдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДГ), катализирующей реакцию восстановления НАД^+ до НАДН [7]. Введение в среду инкубации йодоацетата натрия в конечной концентрации 1 ммоль/л приводило к снижению концентрации АТФ как в контрольном образце, так и в присутствии ФКК. При этом в случае с ФКК содержание АТФ все же было достоверно выше и составляло $(18,78 \pm 2,05)$ нмоль/мг белка против $(13,75 \pm 1,7)$ нмоль/мг белка в контрольном образце. Полученные данные свидетельствуют о том, что низкомолекулярные компоненты ФКК способствуют частичному восстановлению активности ГАФДГ предположительно путем конкуренции за связывание с активным центром фермента.

Также в данной серии экспериментов был использован цитохалазин В (10 мкмоль/л). Добавление ингибитора приводило к достоверному, сопоставимому повышению концентрации АТФ как в контрольном, так и опытном образцах. Вероятно, это связано с тем, что кроме ингибирующего действия цитохалазина В относительно GLUT-1, он является блокаторм цитокинеза, т.е. движения клеток. В связи с тем, что большее количество типов клеток лейкоцитарного ряда очень лабильны, ингибирование способности к движению могло привести к накоплению неиспользованного АТФ.

При исследовании влияния ФКК на концентрацию АДФ в лейкоцитах наблюдалось достоверное ее повышение в варианте инкубации клеток с ФКК, а также с ФКК и йодоацетатом натрия, как и при исследовании АТФ. Из рис. 3 видно, что содержание АДФ

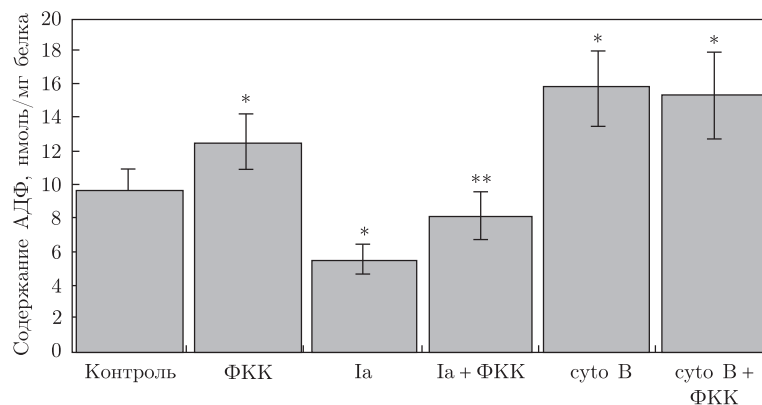


Рис. 3. Влияние ФКК на содержание АДФ в лейкоцитах ($n = 5$): Ia — йодоацетат натрия, cyto B — цитохалазин В

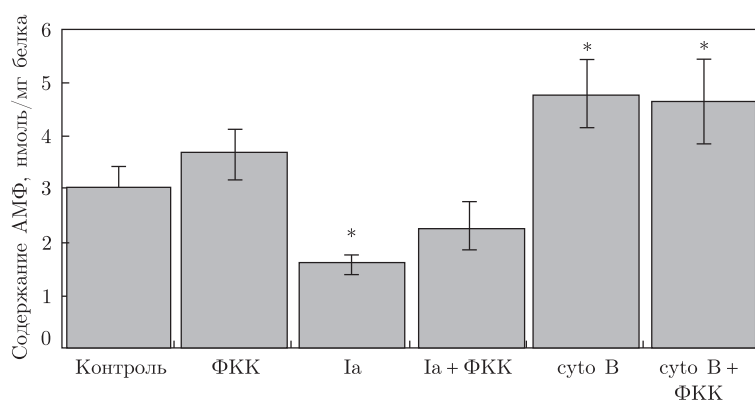


Рис. 4. Влияние ФКК на содержание АМФ в лейкоцитах ($n = 5$): Ia — йодоацетат натрия, cyto B — цитохалазин В

* — Отличия статистически значимы относительно контрольных значений ($p < 0,05$)

в контроле равно $(9,68 \pm 1,21)$ нмоль/мг белка, в то время как добавление ФКК приводило к повышению данного показателя до $(12,51 \pm 1,35)$ нмоль/мг белка.

Как и в случае с АТФ, добавление в среду инкубации йодоацетата натрия приводило к уменьшению концентрации АДФ в контрольном образце и в присутствии ФКК, но в случае с ФКК содержание АДФ все же было достоверно выше в 1,5 раза (см. рис. 3).

Результаты, представленные на рис. 4, демонстрируют, что в заданных условиях ФКК не оказывает влияния на концентрацию АМФ в лейкоцитах. Это объясняется тем, что массовое образование монофосфатов имеет место лишь в случае больших энергетических трат и при условии разряженности аденилатной системы, которая в первую очередь связана с длительным физиологическим стрессом. Незначительное содержание АМФ в рамках данного исследования свидетельствует о том, что клетки не испытывали “срочных” энергетических трат в большом количестве.

В случае ингибиторного анализа с йодоацетатом натрия наблюдалась тенденция к увеличению содержания АМФ в лейкоцитах при внесении в среду инкубации ФКК.

С учетом полученных данных относительно концентрации адениловых нуклеотидов в лейкоцитах был рассчитан аденилатный пул. Общий аденилатный пул определяется путем вычисления суммы АТФ, АДФ и АМФ и характеризует потенциал энергетических трат

клетки: чем он выше, тем больше потенциал активности клеток. Результаты расчета показали, что ФКК способствует достоверному увеличению аденилатного пула по сравнению с контрольными значениями, показатели составили $(50,2 \pm 6,79)$ и $(37,49 \pm 4,09)$ нмоль/мг белка соответственно.

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что механизм действия низкомолекулярной фракции кордовой крови (до 5 кДа) связан с усилением энергетического метаболизма вследствие увеличения содержания глюкозы в клетках и стимуляции синтеза АТФ из АДФ в лейкоцитах крови человека, что также подтверждается повышением общего аденилатного пула клеток.

1. Гулевский А. К., Горина О. Л., Моисеева Н. Н., Степанюк Л. В. Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови и Actovegin на фагоцитарную активность деконсервированных лейкоцитов // Укр. журн. гематології та трансфузіології. – 2010. – № 1. – С. 22–29.
2. Гулевский А. К., Ахатова Ю. С., Моисеева Н. Н. и др. Оценка фагоцитарной активности криоконсервированных с диметилацетамидом нейтрофилов лейкоконцентрата после реабилитации в среде, содержащей низкомолекулярную фракцию кордовой крови (до 5 кДа) // Пробл. криобиологии. – 2012. – 22, № 1. – С. 71–79.
3. Румянцев С. А. Актовегин. Новые аспекты клинического применения. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 2002. – 280 с.
4. Гришина В. В., Тимохина Е. В., Андреева Л. Ю. Система сбора и фракционирования стволовых клеток пуповинной крови // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2004. – 3, № 6. – С. 50–54.
5. Пат. 69652 Україна, МПК А 61К 35/14. Спосіб отримання низькомолекулярної фракції із кордової крові великої рогатої худоби / О. К. Гулевський, Н. М. Моїсєєва, О. С. Абакумова, І. Й. Щенявський, А. Ю. Нікольченко, О. Л. Горіна. – № у 201112006; Заявл. 12.10.2011; Опубл. 10.05.2012. – Бюл. № 9.
6. Медичні імунобіологічні препарати. Методичні рекомендації щодо викладення технологічних регламентів на препарати крові [Настанова з якості 42–3002–011–2005]. – Київ: МОЗ України, 2005. – 144 с. – [Наказ МОЗ України № 376. – від 26.07.2005].
7. Маянский Н. А. Митохондрии нейтрофилов: особенности физиологии и значение в апоптозе // Иммунология. – 2004. – № 5. – С. 307–312.
8. Wood T. E., Dalili S., Simpson C. D. et al. A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death // Mol. Cancer Ther. – 2008. – 7, No 11. – P. 3546–3555.
9. Пинегин Б. В., Маянский Н. А. Нейтрофилы: структура и функция // Иммунология. – 2007. – № 6. – С. 374–382.
10. Гулевский А. К., Веселовская Ю. С. Современные представления о энергетическом обмене лейкоцитов // Укр. журн. гематології та трансфузіології. – 2011. – № 6. – С. 5–18.
11. Scuster D. P., Brody S. L., Zhou Z. et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake // Am. J. Phys. Lung Cell. Mol. Phys. – 2007. – 292, No 4. – P. 845–851.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков
Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь

Поступило в редакцию 20.11.2013

О. К. Гулевський, Ю. С. Ахатова, О. О. Сисоєв, І. В. Сисоєва

Стимулювальна дія низькомолекулярної фракції кордової крові на енергетичний обмін в лейкоцитах

Методом хемолумінесцентного аналізу визначено вміст АТФ, АДФ й АМФ у клітинах лейкоконцентрату, підданих інкубації в середовищі, що містить низькомолекулярну (до 5 кДа) фракцію кордової крові (0,15 мг/мл). Встановлено, що дана фракція значимо сти-

мулює нагромадження АТФ й АДФ і не впливає на вміст АМФ. Стимулювальний ефект низькомолекулярної фракції кордової крові блокувався інгібітором гліколізу, йодоацетатом Na та інгібітором транспорту глюкози, цитохалазином В. Показано, що низькомолекулярна фракція з кордової крові сприяє збільшенню аденілатного пулу лейкоцитів. Також експериментально встановлено, що присутність в інкубаційному середовищі низькомолекулярної фракції кордової крові сприяє нагромадженню глюкози клітинами лейкоконцентрату.

O. K. Gulevsky, Yu. S. Akhatova, A. A. Sysoev, I. V. Sysoeva

Stimulating effect of a low-molecular fraction from cord blood on the energy metabolism in leukocytes

The ATP, ADP, and AMP contents are determined in leukoconcentrate cells after incubation in a medium containing a low-molecular fraction (below 5 kDa) from cord blood (0.15 mg/mL) by chemiluminescent analysis. It is shown that the fraction significantly stimulates the accumulation of intracellular ATP and ADP and has no effect on the AMP content. The stimulatory effect of the low-molecular fraction from cord blood is blocked by a glycolysis inhibitor, iodoacetate Na, and a glucose transport inhibitor, cytochalasin B. It is found that the fraction from cord blood enhances the total adenylate pool of leukocytes. It is established experimentally that the presence of the low-molecular fraction from cattle cord blood stimulates the glucose accumulation in leukoconcentrate cells.