

кутом зору сприйнятливості їх до уrogenітальних інфекцій. Встановлено, що дана група характеризується достовірно підвищеною частотою алелі G – алелі високої експресії та генотипу високої експресії ІЛ–10 (GG–генотип) та порушенням механізму продукції антитіл із залученням імунорегуляторних Т–лімфоцитів. Припускається, що імунні порушення у жінок є первинними і такими, що сприяють їх ураженню уrogenітальними інфекціями, і як результат, навиковому невиношуванню вагітності.

Изучали состояние клеточного иммунитета, точечные нуклеотидные полиморфизмы промоторного участка гена ИЛ–10 в группе женщин с привычным невынашиванием беременности с точки зрения восприимчивости их к уrogenитальным инфекциям. Установлено, что данная группа характеризуется достоверно повышенной частотой аллеля G – аллеля высокой экспрессии ИЛ–10 и генотипа высокой экспрессии (GG–генотип) и нарушением механизма продукции антител при вовлечении иммунорегуляторных Т-лимфоцитов. Допускаем, что иммунные нарушения у женщин – первичные и такие, что способствуют инфицированию уrogenитальными инфекциями, и как результат, привычному невынашиванию беременности.

Studied the condition of the cellular immunity and the SNP1082 G→A of the gene IL–10 promotor region in women with recurrent miscarriage with a view of their sensitivity to the urogenitalic infections. As a result of studying was determined statistically significant increase of both IL–10 high expression allele frequency (G–allele) and IL–10 high expression genotype frequency (GG–genotype). Studied the condition of the cellular immunity in women with recurrent miscarriage with a view of their sensitivity to the urogenitalic infections. It is established that women with recurrent miscarriage have the infringement of the antibody production mechanism. It is supposed, that immunological disfunction in women are prioritive and such that help their perception by urogenitalic infections and as a result this urogenitalic infections is the recurrent miscarriage.

КРАСНОВ М.С., *СМУТОВА В.А., **МАРГАСЮК Д.В., **БЕРЕЗИН Б.Б., **БИТКО С.А., ЯМСКОВА В.П., **ЯМСКОВ И.А.

Учреждение российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26, e-mail: embrmsk@mail.ru

**Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Россия, 119991, Москва, Воробьевы горы, 1*

***Учреждение российской академии наук Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АКТИВНОСТЬ В СВЕРХМАЛОЙ ДОЗЕ БИОРЕГУЛЯТОРА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СЕМЕННИКОВ КРЫС.

Бесплодие у мужчин возникает в результате разнообразных патологических процессов в организме, оказывающих отрицательное воздействие на внутренние органы, эндокринные железы, центральную нервную систему, приводя к дистрофическим изменениям в семенных канальцах и ткани яичка, способствуя при этом ухудшению оплодотворяющей способности сперматозоидов. Поэтому поиск и разработка новых препаратов для стимуляции и поддержания сперматогенеза является актуальным вопросом современной медицины. Ранее в различных тканях позвоночных нами была обнаружена группа биорегуляторов, действующих в сверхмалых дозах (СМД) [Borisenko et al., 2007; Krasnov et al., 2007; Margasyuk et al., 2007; Nazarova et al., 2007; Yamskova et al., 2007a,b]. Данные биорегуляторы обладали способностью поддерживать и восстанавливать ткани после повреждения, стимулировать клеточную

пролиферацию, адгезию, миграцию. На основе некоторых биорегуляторов в настоящее время разработаны лекарственные препараты, обладающие профилактическим и лечебным эффектом [Ямсков, Ямскова, 1998]. Биорегуляторы данной группы обладают тканеспецифическим действием, но не обладают видоспецифическим действием [Ямскова и др., 1977; Borisenko et al., 2007; Krasnov et al., 2007; Margasyuk et al., 2007; Nazarova et al., 2007; Yamskova et al., 2007a]. В настоящей работе была произведена попытка идентифицировать биорегулятор данной группы в тканях семенников крыс и изучить его протекторное действие в отношении данной ткани.

Материалы и методы

Биорегулятор был выделен из тканей семенников половозрелых крыс по разработанной методике. Ткани экстрагировали в растворе, содержащем 1мМ CaCl₂, 0,15М NaCl, 1мМ HEPES, при 4-6 °С в течение 2,5-3,0 ч. Высаливание тканевых экстрактов осуществляли, прибавляя при перемешивании сухой сернокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли. После центрифугирования (3000 g, 10 мин) собирали фракцию надосадочной жидкости – супернатант, которую длительно диализовали до полного удаления сернокислого аммония, осуществляя многократную смену воды. Жидкостную ионнообменную хроматографию проводили на препаративной колонке (2,0 см x 30 см), используя ДЭАЭ-52-целлюлозу (“Serva”, Германия). Сорбент уравнивали 0,2М калий-фосфатным буфером (КФБ) pH 4,0. Элюцию проводили ступенчато: 0,2М КФБ pH 4,0 – 80 мин.; 0,2М КФБ pH 8,0 + 1М NaCl 120-150 мин., со скоростью 30 мл/час. Детекцию фракций белков проводили спектрофотометрически при 280 нм (“Gilson”, Франция). Для обращенно-фазовой ВЭЖХ применяли хроматограф Agilent 1100 Series (США), колонка Биохиммак С8-200 (4.6 мм x 150 мм), градиент вода (0,1% ТФА)–ацетонитрил, скорость элюции 0.5мл/мин. Размер белковых частиц в растворах определяли методом лазерного динамического светорассеивания [Stepanek, 1993]. Для биотестирования фракций РБ использовали ранее разработанный адгезиометрический метод [Ямскова, Резникова, 1991].

Протекторное действие исследуемого биорегулятора в СМД (10⁻¹⁴ мг/мл) изучали на модели органного роллерного культивирования семенников мышей. Использовали роллер RM5 (Assistant, Германия) со скоростью вращения 35 об/мин. Семенники мыши целиком помещали во флаконы с культуральной средой 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% антибиотик/антимикотик (Sigma). В контрольные флаконы ничего не добавляли, а в опытные добавляли биорегулятор, выделенный из семенников крыс. Культивирование проводили при 37⁰ С в течение 4-х суток. Далее исследовали гистологию семенников и семенных канальцев с помощью световой микроскопии.

Результаты и обсуждение

По ранее разработанной схеме нами была выделена из тканей семенников крыс фракция супернатанта. Для идентификации в ее составе биорегулятора изучаемой группы был применен метод биотестирования, который показал наличие биорегулятора в данной фракции. Было обнаружено мембранотропное действие биорегулятора семенников в СМД, соответствующих концентрациям 10⁻⁶-10⁻¹⁵ мг/мл (Рис. 1).

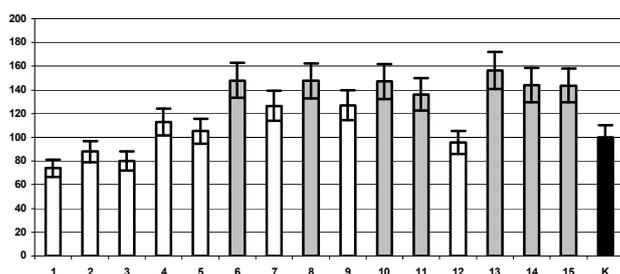


Рис. 1. Мембранотропное действие фракции супернатанта биорегулятора семенников крысы. По оси абсцисс: степень десятикратного разведения фракции (исходная концентрация 80 мкг/мл); по оси ординат - величина эффекта (%). Серые столбики – активные концентрации биорегулятора.

Далее исследовали некоторые физико-химические свойства белков, входящих в состав данной фракции: определяли вторичную структуру методом кругового дихроизма и способность к агрегации в водных растворах методом лазерного динамического светорассеивания. Было показано, что во вторичной структуре биорегулятора семенников преобладают β -структуры и статистический клубок. Такую же структуру имеют и другие биорегуляторы изучаемой группы, действующие в СМД. Ранее для всех биорегуляторов была показана способность образовывать в водных растворах крупные наноразмерные ассоциаты [Krasnov et al., 2007; Margasyuk et al., 2007; Nazarova et al., 2007; Vorisenko et al., 2007; Yamskova et al., 2007a]. Для биорегулятора семенников также была обнаружена такая способность. Было показано, что в водных растворах молекулы биорегулятора образуют частицы размером около 90 нм. По совокупности физико-химических свойств и мембранотропной активности исследуемый биорегулятор можно отнести к группе биорегуляторов, действующих в СМД. Далее была изучена специфическая активность биорегулятора семенников крысы на модели роллерного органного культивирования целых семенников мыши. Данная модель была нами разработана и применена впервые. В контрольных культурах, после 4-х дней культивирования наблюдали процессы деградации интерстиции семенных канальцев, разрушения внеклеточного матрикса и гематотестикулярного барьера, а также выраженную гибель клеток и сперматозоидов. В опыте наблюдали протекторное действие биорегулятора, которое выражалось в поддержании структуры канальцев, адгезионных взаимодействий между канальцами, предотвращении деградации интерстиции. Кроме того, поддерживалась жизнеспособность и дифференцировка клеток, включая сперматозоиды в семенных канальцах (Рис. 2).

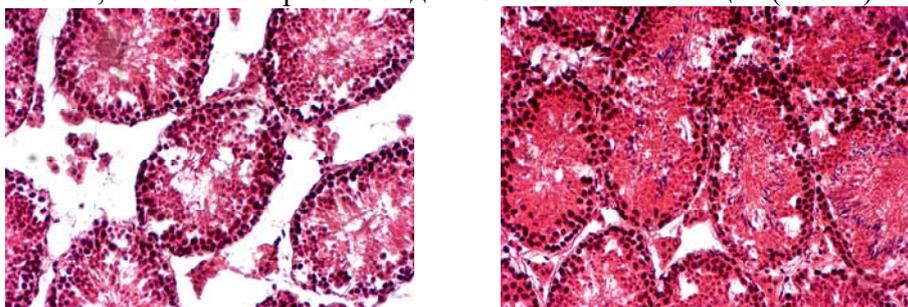


Рис. 2. Роллерное органное культивирование семенников мышей в течение 4-х суток *in vitro*. Слева – контроль, справа – опыт (добавление биорегулятора семенников). Ув. ок. $\times 10$; об. $\times 20$.

Полученные данные указывают на то, что данный биорегулятор может быть использован в качестве средства, способствующего поддержанию процессов сперматогенеза и предотвращению от деградации ткани семенников. В дальнейшем мы подтвердим данные, полученные нами в экспериментах *in vitro*, экспериментами *in vivo*. Также для получения более очищенной фракции биорегулятора нами были использованы методы хроматографии. Сначала, фракцию супернатанта разделяли методами ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, в результате чего получили 4 фракции (Рис. 3).

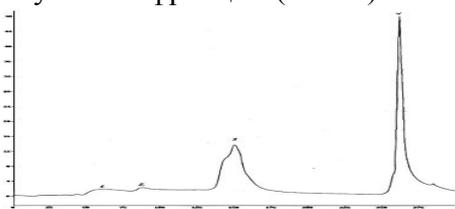


Рис. 3. Жидкостная ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Фракционирование супернатанта семенников крыс (1 пик – основная фракция белков; 4 пик – кислая фракция белков). По оси абсцисс – время элюции, мин; по оси ординат – D_{280} .

В дальнейшей работе исследовали кислую фракцию, которая элюировалась с колонки последней. Выбрали данную фракцию в связи с тем, что ранее было показано для

биорегуляторов других тканей, что именно кислые фракции обладали наибольшим эффектом биологического действия. Кислую фракцию разделяли далее методом обращено-фазовой ВЭЖХ (Рис. 4).

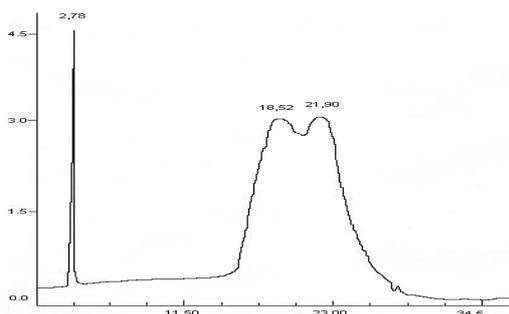


Рис. 4. Обращено-фазовая ВЭЖХ (вода-ацетонитрил) кислой фракции биорегулятора семенников крысы. По оси абсцисс – время элюции (мин). По оси ординат – детекция при длине волны 280 нм.

В результате получили гидрофильную (время удерживания 2,78 мин) и гидрофобные фракции (времена удерживания 18,52 и 21,90 мин). Сходную картину разделения мы получали и для биорегуляторов выделенных из других тканей. В связи с этим предполагается в дальнейшем использовать гидрофильную фракцию, наиболее гомогенную и обладающую более выраженным эффектом.

Выводы

Нами был идентифицирован в ткани семенников крыс биорегулятор, действующий в сверхмалых дозах. По совокупности физико-химических свойств и мембранотропного действия его можно отнести к группе биорегуляторов, действующих в СМД. Данный биорегулятор обладал протекторным действием в отношении тканей и клеток семенников мыши в процессе их переживания в условиях органного роллерного культивирования *in vitro*.

Литература

1. Ямскова В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г. Высокоактивные тканевоспецифические адгезионные факторы печени и легкого // Молекулярная биология. -1977. -т.11. N5. -С. 1147-1154.
2. Ямскова В.П., Резникова М.М. Низкомолекулярный полипептид сыворотки крови теплокровных: влияние на клеточную адгезию и пролиферацию // Журнал общей биологии. -1991. -т.52, N2, -С. 181-191.
3. Ямсков И.А., Ямскова В.П. Фармакологические препараты нового поколения на основе ранее неизвестных биорегуляторов-гликопротеинов клеточного микроокружения // Рос. хим. ж. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). -1998. -Т.42. N3. -С.85-90.
4. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Vecherkin V.V., Yamskov I.A. "Regulatory proteins from the mammalian liver that display biological activity at ultra low doses" pp. 35-45 // In the book "[Biochemical Physics Frontal Research](#)", Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.
5. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. "Analysis of a Regulatory Peptide from the Bovine Eye Lens: Physicochemical Properties and Effect on Cataract Development in vitro and in vivo" pp. 21-33 // In the book "[Biochemical Physics Frontal Research](#)", Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.
6. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. "Regulatory Protein from Bovine Cornea: Localization and Biological Activity", pp. 47-59 // In the book "[Biochemical Physics Frontal Research](#)", Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.
7. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Filatova A.G., Yamskov I.A. "Regulatory proteins biologically active in ultralow doses from mammalian glands and their

secretions” In: New Trends in Biochemical Physics Research, Editors: S.D. Varfolomeev et al., pp. 73-82, NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 128.

8. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V. and Yamskov I.A. “Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 1. Isolation, purification and physicochemical properties.”, pp. 61-70 // In the book “Biochemical Physics Frontal Research”, Ed. by Varfolomeev S.D., Burlakova E.B., Popov A.A. and Zaikov G.E., Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.

9. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Borisenko A.V., Yamskov I.A. “Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 2. Tissue localization and role in wound healing”, pp. 71-78 // In the book “[Biochemical Physics Frontal Research](#)”, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.

10. Stepanek P. Dynamic Light Scattering. The method and some applications // Ed. By Brown W. Oxford: Clarendon Press. 1993. P. 177

Резюме

В ткани семенников крыс был идентифицирован биорегулятор, действующий в сверхмалых дозах на поддержание структуры семенных канальцев и препятствие гибели клеток семенников в условиях переживающей органотипической культуры *in vitro*.

In a tissue of rats testis have been identified a bioregulator active in ultra low dozes on maintenance of structure of tubuli seminiferi and an obstacle of destruction of testis cells in conditions of experiencing organotypic culture *in vitro*.

ПЛІНСЬКА М.А., ДИБСЬКИЙ С.С., ДИБСЬКА О.Б., ПЕДАН Л.Р.

*Науковий Центр радіаційної медицини АМН України,
Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: pww@ukr.net*

РЕАЛІЗАЦІЯ ПРИХОВАНОЇ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ У ВІДДАЛЕНІ СТРОКИ ПІСЛЯ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АВАРІЇ

Оцінка прихованої хромосомної нестабільності є перспективним напрямком цитогенетичних досліджень, які впродовж останніх 10-ти років проводяться в різних цитогенетичних лабораторіях світу, переважно, для визначення ризику виникнення спонтанної чи індукованої онкопатології за гіперчутливістю хромосом лімфоцитів периферичної крові людини до кластогенної дії т. з. мутагенів-провокаторів, одним з яких є радіоміметик блеоміцин [1]. Встановлено, що індивідуальна чутливість хромосом соматичних клітин до тестуючої мутагенної дії блеоміцину *in vitro* не залежить від статі, віку людини та повсякденного навантаження мутагенними факторами довкілля і є генетично детермінованою, що обумовлено певними молекулярно-генетичними механізмами та доведено відповідними дослідженнями на близнюках [2 - 6].

Питання щодо модифікації генетично детермінованої міжіндивідуальної чутливості геному людини до дії мутагенів довкілля, включаючи іонізуюче випромінювання, досі залишається відкритим. Разом з тим, враховуючи актуальність цієї проблеми в зв'язку з медичними наслідками Чорнобильської аварії, метою нашого дослідження було саме визначення можливості реалізації прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини у віддалені строки після радіаційного впливу різної інтенсивності.