

УДК 612.015.1

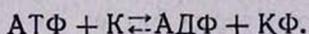
Л. С. НЕРСЕСОВА, И. П. АШМАРИН, С. Н. ЛЫЗЛОВА

КРЕАТИНКИНАЗА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ:
ВЫЯВЛЕНИЕ, СВЯЗЬ С ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТЬЮ КЛЕТОК, НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА

В перитонеальных макрофагах кролика, морской свинки и мыши обнаружен фермент креатинкиназа. При этом установлены видовые различия активности фермента. Показано участие креатинкиназы в обеспечении энергией процессов фагоцитоза, пиноцитоза, а также распластывания и перемещения макрофагов по поверхности стекла.

Изучены некоторые свойства фермента макрофагов мыши и кролика.

Креатинкиназа—фермент энергетического обмена, который обеспечивает постоянство уровня АТФ в клетке как за счет передачи фосфорильного остатка с креатинфосфата на АДФ, (в цитоплазме), так и за счет транспорта макроэргов от АТФ на креатин (в митохондриях) по уравнению:



По данным последних лет, креатинкиназа участвует в регуляции таких важных метаболических процессов, как гликолиз [24], окислительное фосфорилирование [17], ресинтез гликогена [16].

Общепринято считать, что основным местом локализации фермента являются мышечная и нервная ткани. Однако в настоящее время существенная активность креатинкиназы обнаружена в почках [4, 9], некоторых железах [9, 23, 26] и тромбоцитах [20] ряда животных. Эти наблюдения позволяют заключить, что креатинфосфат-креатинкиназная система принимает участие в обеспечении энергией не только процессов мышечного сокращения и нервной деятельности.

Высокий уровень энергетического обмена фагоцитов, особенно в период их функциональной активности [18, 22 и др.], данные по влиянию ингибиторов гликолиза и окислительного метаболизма на фагоцитоз [12, 18, 22 и др.], а также определенная аналогия в функционировании и метаболизме фагоцитов и мышцы позволили нам высказать предположение о наличии креатинкиназы в этих клетках и участии креатинфосфат-креатинкиназной системы в обеспечении энергией процесса эндоцитоза. Наше предположение подтвердилось [3, 7, 11, 12]. В настоящей работе приводятся данные об уровне активности креатинкиназы в перитонеальных макрофагах и физиологической роли этого фермента в их жизнедеятельности, а также данные о некоторых свойствах креатинкиназы макрофагов.

Материал и методы

Объектом исследования являлись перитонеальные макрофаги мыши, морской свинки и кролика. Опыты проводили с гомогенатами и экстрактами клеток из индуцированных экссудатов [3, 7] и гомогенатами первичной культуры макрофагов [7].

В качестве объекта фагоцитоза в культуре макрофагов морской свинки использовали S- и R-формы *E. coli* O-124. Доза заражения составляла 4—8×10⁶ бактерий в 1 мл среды. Взаимодействие макрофагов с бактериями длилось 30 минут. Объектом пиноцитоза служил бактериофаг T2. В этом случае использовали культуру макрофагов мыши. Клетки инкубировали в среде, содержащей фаговые частицы (1×10⁶ в 1 мл), в течение 4 часов [7].

Активность креатинкиназы в опытных препаратах соотносили с активностью фермента в контрольных препаратах, в которых отсутствовал объект эндоцитоза. В отдельных опытах одновременно с проведением биохимического анализа оценивали фагоцитарную (по общепринятым фагоцитарным показателям) и пиноцитарную (путем определения показателя захвата) активность макрофагов [7]. Активность креатинкиназы определяли по методу Эннора и Розенберга [13] с некоторыми модификациями [5, 7].

Электрофоретическое разделение экстрактов макрофагов в геле крахмала проводили по методу Смитса [28] в модификации Лызловой и сотр. [6]. Определение содержания белка в гомогенатах и экстрактах клеток проводили по методу Лоури [19]. Величины констант Михаэлиса рассчитаны графически и по соответствующему уравнению [1]. Для статистической обработки результатов опытов использовали экспрессные методы [2] и метод однофакторного дисперсионного анализа [8].

Результаты и обсуждение

Результаты опытов по определению активности креатинкиназы в перитонеальных макрофагах мыши, морской свинки и кролика свидетельствуют о наличии в них значительной активности фермента (табл. 1).

Боле четкое представление об уровне активности креатинкиназы в макрофагах дает сравнительная оценка активности фермента в этих клетках и тканях, для которых характерно наличие креатинкиназы. Так, активность креатинкиназы макрофагов белой мыши составляет примерно 10, 7 и 2% от активности фермента в сердечной мышце, головном мозге и скелетной мышце мыши [9] соответственно. Сопоставление наших данных с данными литературы [12] показало, что перитонеальные и альвеолярные макрофаги кролика проявляют почти одинаковую креатинкиназную активность. В то же время, как следует из данных табл. 1, существуют видовые различия креатинкиназной активности перитонеальных макрофагов. По мере убывания активности фермента.

Таблица 1

Активность креатинкиназы в гомогенатах перитонеальных макрофагов мыши, морской свинки и кролика

| Мышь | | Морская свинка | | Кролик |
|-------------------|------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| I | II | I | II | I |
| 19,66±4,14 (7) | 2,89±0,48 (7) | 54,23±12,32 (3) | 5,98±0,71 (3) | 66,00±6,03 (2) |

(I — мкмоль креатина \times час⁻¹ $\times 10^{-8}$ клеток; II — мкмоль креатина \times час⁻¹ \times \times мг⁻¹ белка).

Эти клетки можно расположить в следующий ряд: макрофаги кролика, морской свинки и мыши.

В настоящее время зависимость эндоцитоза от энергии метаболических процессов не вызывает сомнений [18, 22 и др.]. Предполагают, что эндоцитоз — форма клеточного движения, в процессе которого химическая энергия АТФ трансформируется в механическую работу по транслокации клеточной мембраны и периферической цитоплазмы, необходимой для поглощения частицы [10, 22, 25]. Поэтому для выявления роли креатинфосфат-креатинкиназной системы в жизнедеятельности фагоцитов мы исследовали активность креатинкиназы в процессе фагоцитоза бактерий и пиноцитоза фаговых частиц, а также распластывания и перемещения макрофагов по поверхности стекла при культивировании их. В связи с последним следует отметить, что ряд авторов рассматривает распластывание макрофагов на стекле как своеобразную форму эндоцитоза, когда клетка пытается фагоцитировать частицу бесконечного диаметра. Показано, что в процессе распластывания макрофагов утилизируется АТФ [22] и участвуют те же сократительные структуры, что и в процессе фагоцитоза [25].

Результаты опытов, представленные на рис. 1, указывают на возрастание активности креатинкиназы макрофагов в процессе эндоцитоза и культивирования их. Это свидетельствует об участии креатинфосфат-креатинкиназной системы в ресинтезе АТФ, потребляемой при пиноцитозе, фагоцитозе, распластывании и перемещении макрофагов по поверхности стекла. Увеличение активности креатинкиназы макрофагов мыши при пиноцитозе бактериофага Т2 (рис. 1, А) только лишь на 13% ($\beta_2=0,99$) объясняется, по-видимому, тем, что энергетические затраты клетки в процессе пиноцитоза сравнительно невелики [22]. Возрастание активности креатинкиназы макрофагов морской свинки при фагоцитозе S- и R-форм *E. coli* (рис. 1, Б) более чем на 50% ($\beta_2=0,99$) согласуется с многочисленными литературными данными об увеличении интенсивности энергетического обмена фагоцитирующих клеток [18, 22, 25 и др.]. Особый интерес в нашем случае представляют данные о том, что в присутствии Mg^{++} АТФ-азная активность макро-

фагов морской свинки при фагоцитозе *B. subtilis* увеличивается на 66% [21].

Наибольшее возрастание активности креатинкиназы было отмечено при сравнении активности фермента исходных засеваемых макрофагов

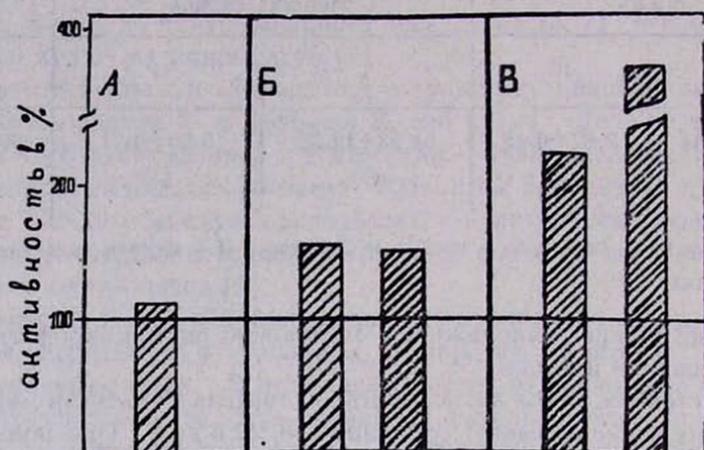


Рис. 1.

и соответствующей им 4-часовой культуры клеток (рис. 1, В). Учитывая зависимость энергетических трат клетки от размера поглощаемой частицы [18, 22], можно предположить, что при распластывании макрофагов на стекле требуется большее количество энергии, чем при фагоцитозе бактерий. Кроме того, при культивировании клеток креатинфосфат-креатинкиназная система, по-видимому, вовлекается в обеспечение энергией также процессов перемещения макрофагов по поверхности стекла и фагоцитоза разрушенных при извлечении из экссудатов клеток.

Таким образом, креатинфосфат-креатинкиназная система участвует в энергообеспечении важнейших функций макрофагов: пиноцитоза, фагоцитоза, распластывания и перемещения клеток. Значительная транслокация клеточной мембраны и периферической цитоплазмы в ходе перечисленных процессов требует быстрой мобилизации энергии, особенно в начальный период функционирования клетки. На основании полученных данных можно полагать, что в этом случае в качестве источника ресинтеза АТФ используется креатинфосфат-креатинкиназная система как наиболее динамичный энергетический резерв клетки.

На следующем этапе работы были исследованы некоторые свойства креатинкиназы макрофагов мыши и кролика.

Электрофоретическое фракционирование экстрактов макрофагов (1,4), мозга (2,5) и мышцы (3,6) кролика и мышцы в геле крахмала выявило сходство электрофоретической подвижности креатинкиназы фагоцитов и фермента мозга этих животных (рис. 2). Последнее свидетельствует о близости креатинкиназы макрофагов к изоферменту I («мозго-

вого типа»). Анализ литературных данных показал, что именно изофермент I—форма креатинкиназы, преобладающая в тканях и органах, отличных от скелетной и сердечной мышц. Так, кроме нервной ткани, изофермент I содержит гладкие мышцы [23, 26], эндокринные железы:

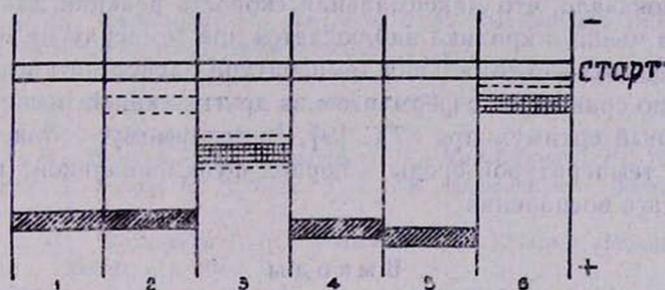


Рис. 2.

[23], тромбоциты [21], фибробласты [29], почки, печень и другие висцеральные органы [26]. Как предполагают некоторые авторы [4, 26], изофермент I—наиболее древняя форма креатинкиназы, характеризующаяся меньшей функциональной специфичностью, чем изофермент 3 («мышечного типа»).

Обнаружение в макрофагах креатинкиназы, близкой по электрофоретической подвижности к изоферменту 1, хорошо согласуется также с гипотезой о том, что наличие изофермента 3 креатинкиназы в ткани коррелирует с присутствием в ней миофибриллярного актомиозина, а изофермента 1—немиофибриллярного актомиозина [29]. Недавно в фагоцитах обнаружен актомиозинподобный белок, организованный в структуры, отличающиеся от сократительного аппарата мышц [10, 25, 27].

О близости креатинкиназы макрофагов к изоферменту 1 свидетельствуют также величины констант Михаэлиса (K_m), рассчитанные для КФ и Mg—АДФ. При сравнении их с соответствующими значениями K_m креатинкиназы мозга и скелетной мышцы кролика [14, 15] следует, что они ближе к значениям K_m для креатинкиназы мозга (табл. 2).

Таблица 2
Константы Михаэлиса креатинкиназы (мМ)

| Объект | КФ | Mg—АДФ | Литературный источник |
|-------------------------|------|--------|-----------------------|
| Макрофаги мыши | 2,09 | 0,25 | наши данные |
| Макрофаги кролика | 2,66 | 0,19 | |
| Мозг кролика | 1,80 | 0,25 | [14] |
| Скелетная мышца кролика | 3,80 | 0,83 | [14] |
| Скелетная мышца кролика | 5,00 | 0,80 | [15] |

Зависимость скорости креатинкиназной реакции экстракта макрофагов мыши от рН среды имела такой же характер, как рН—зависимость скорости этой реакции для креатинкиназы мозга и скелетной мышцы кролика. Ее оптимум находится при рН 7,2 [7].

Изучение зависимости скорости креатинкиназной реакции от температуры показало, что максимальная скорость реакции для фермента макрофагов мыши и кролика наблюдается при температуре 40°C [3, 7].

Более высокая оптимальная температура действия креатинкиназы фагоцитов по сравнению с ферментом из других тканей мыши, имеющих температурный оптимум при 37°C [9], по-видимому, объясняется повышенной температурой среды в период функциональной активности клеток в очаге воспаления.

Выводы

1. В перитонеальных макрофагах кролика, морской свинки и мыши обнаружен фермент креатинкиназа. При этом установлены видовые различия. По уровню креатинкиназной активности эти клетки можно расположить в следующий нисходящий ряд: макрофаги кролика, морской свинки и мыши.

2. При пиноцитозе фаговых частиц, фагоцитозе бактерий, а также распластывании и перемещении макрофагов по поверхности стекла в процессе культивирования их активность креатинкиназы увеличивается. Это свидетельствует о вовлечении креатинфосфат-креатинкиназной системы в энергообеспечение указанных процессов.

3. Изучены некоторые свойства креатинкиназы макрофагов кролика и мыши. По электрофоретической подвижности и величинам K_m для КФ и Mg—АДФ креатинкиназа макрофагов близка к изоферменту 1.

Институт экспериментальной биологии АН Арм. ССР,

Ленинградский государственный университет,

кафедра биохимии

Поступила 4/V 1975 г.

Լ. Ս. ՆԵՐՍԵՍՈՎԱ, Ի. Պ. ԱՇՄԱՐԻՆ, Ս. Ն. ԼԻԶԼՈՎԱ

ՊԵՐԻՏՈՆԵԱԿԱՆ ՄԱԿՐՈՖԱԳԵՐԻ ԿՐԵԱՏԻՆԿԻՆԱԶԱՆ

Ա Վ Փ Ն Փ Ն Ո Ւ Մ

Մկան, ժովախոզուկի և ճագարի պերիտոնեալ մակրոֆագերում հայտնաբերված է կրեատինկինազ ֆերմենտը և ուսումնասիրված են նրա մի շարք հատկությունները: Բջջաներում հաստատված են կրեատինկինազային ակտիվության տեսակային տարբերություններ: Ցույց է տրված կրեատինկինազի մասնակցությունը այնպիսի պրոցեսների էներգիայի ապահովման գործում, ինչպիսիք են՝ պինոցիտոզը, ֆագոցիտոզը, ինչպես նաև ադգեզիան և ապակու մակերևույթով մակրոֆագերի տեղափոխության երևույթը, նրանց կուտիվացիայի ընթացքում:

Ըստ էլեկտրաֆորետիկ շարժունության և Km-ի մեծության մակրոֆագերի կրեատինկինազը պատկանում է իզոֆերմենտ 1 տիպին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агол В. И. Биохимия, 1960, 25, стр. 1092.
2. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Л., 1971.
3. Ашмарин И. П., Лызлова С. Н., Нерсесова Л. С., Фрейдлин И. С. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1973, 24, 9, стр. 43.
4. Лызлова С. Н. Фосфагенкиназы. Л., 1974.
5. Лызлова С. Н., Дюнда А. К., Ашмарин И. П., Чихиржина Г. И., Южакова Г. А., Андрус Н. В., Калаус Н. Э., Райзе Т. Э. Ж. эволюционной биохимии и физиологии, 1968, 4, стр. 3.
6. Лызлова С. Н., Чихиржина Г. И., Южакова Г. А. Вестник Ленинградского университета, 1968, 21, стр. 104.
7. Нерсесова Л. С., Фрейдлин И. С. Биохимия, 1974, 39, 5, стр. 1087.
8. Плохинский Н. А. Биометрия. М., 1970.
9. Южакова Г. А. Автореферат дисс. канд. Л., 1973.
10. Allison A. C., Davies P., De Petris S. Nature. New Biology, 1971, 232, 153.
11. Ashmarin I. P., Lyslova S. N., Nersesova L. S., Freidlin I. S. The Scandinavian J. of Clinical and Laboratory Investigation, 1972, 29, suppl. 126, 23, 49.
12. De Chatelet L. R., McCall Ch. E., Shirley P. S. Infection and Immunity, 1973, 7, 29.
13. Ennor A. H., Rosenberg H. Biochemical J., 1964, 57, 203.
14. Eppenberger H. M., Dawson D. M., Kaplan N. O. J. of Biological Chemistry, 1967, 242, 204.
15. Kuby S. A., Noda A., Lardy H. A. J. of Biological Chemistry, 1954, 219, 65.
16. Fu J., Kemp N. G. J. of Biological Chemistry, 1973, 248, 1124.
17. Jacobus W. K., Lehninger A. L. J. of Biological Chemistry, 1973, 248, 4803.
18. Karnovsky M. L., Simmons S., Glass E. A., Shafer A. W., Arey Hart P. D. In: Mononuclear Phagocytes, Oxford—Edinburgh, 1970, 103.
19. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. of Biological Chemistry, 1951, 193, 265.
20. Meltzer H. F., Guschwan A. Life Sciences, 1972, 11, 121.
21. Nachkov D., Trankova K. Доклады Сельскохозяйственной Академии НРБ, 1972, 5, 367.
22. North R. J. Seminars in Hematology, 1970, 7, 161.
23. Ohto J. Shikoku Acta Medica, 1970, 26, 505.
24. Oguchi M., Gerth E., Fitzgerald B., Park J. H. J. Biological Chemistry, 1973, 248, 5571.
25. Reaven E. P., Axlte S. C. J. of Cell Biology, 1973, 59, 12.
26. Richterich R., Wiesmann U., Cantz B. In: Homologous enzymes and biochemical evolution, New-Jork—London—Paris, 1968, 243.
27. Shibata N., Tatsumi N., Tanaka K., Okamura Y., Senda N. Biochem. Biophys. Acta, 1972, 256, 565.
28. Smithies O. Biochemical J., 1959, 71, 585.
29. Turner D. C., Eppenberger H. M. Enzyme, 1973, 15, 224.