

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОТКЛИКА КЛЕТОК

С.Н. Черенкевич, А.Б. Самаль, Г.Н. Семенова,
А.В. Тимошенко, А.И. Хмельницкий

Выбранные научовыя працы Беларускага
дзяржаўнага універсітэта. У 7 тамах. Том
VII. Біялогія. Геаграфія.- 2001.- С. 175-186.

Мінск

БДУ

2001

**ВЫБРАННЫЯ
НАВУКОВЫЯ ПРАЦЫ
БЕЛАРУСКАГА ДЗЯРЖАЎНАГА
УНІВЕРСІТЭТА**

У СЯМІ ТАМАХ

**VII
ТОМ**

**БІЯЛОГІЯ
ГЕАГРАФІЯ**

**МІНСК
БДУ
2001**

С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ, А. Б. САМАЛЬ, Г. Н. СЕМЕНКОВА,
А. В. ТИМОШЕНКО, А. И. ХМЕЛЬНИЦКИЙ

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОТКЛИКА КЛЕТОК

ВВЕДЕНИЕ

Функционирование клеток обеспечивается физико-химическими и биофизическими процессами, происходящими в цитоплазме и органеллах клетки, ее многочисленных мембранных структурах. Внешние физические и химические факторы способны активировать в клетках сложные последовательности событий, характеризующихся высокой степенью специфичности во взаимодействиях, информационно обеспечиваемых отдельными молекулами или молекулярными комплексами. Наряду с расшифровкой генома человека актуальными являются проблемы установления молекулярных механизмов постгенетических событий в клетках, взаимокорреляции внутриклеточных сигнальных реакций, определения ключевых медиаторов клеточной реактивности и индукции эффекторных молекул.

Настоящая работа посвящена исследованию биофизических и функциональных свойств клеток в норме и при различных заболеваниях. Изучены такие ключевые стадии клеточного отклика, как молекулярное узнавание, трансдукция сигналов, генерация физико-химических посредников (мессенджеров) при физиологических условиях и при изменении параметров среды (температуры, pH, ионной силы и др.), для большого числа клеток животных и человека, а также механизмы перекисного окисления липидов биологических и модельных мембран.

МЕССЕНДЖЕРНАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Супероксидные анион-радикалы (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильные радикалы ($\cdot OH$) и синглетный кислород (1O_2) называются активными формами кислорода (АФК), поскольку обладают высокой реакционной способностью в отличие от молекулярного кислорода (O_2). В организме человека и животных АФК образуются при действии многих физико-химических факторов (ионизирующей радиации, лазерного излучения, токсических соединений, лекарственных веществ и др.), а также при воспалительных и некоторых других патологических процессах. До недавнего времени АФК рассматривались преимущественно как цитотоксические факторы. Однако видение проблемы только в таком аспекте и связанное с этим применение антиоксидантов являлось односторонним подходом, не учитывающим поливариантность влияния АФК на функциональные свойства систем,

обеспечивающих трансдукцию сигналов в клетках. Ниже приведены экспериментальные результаты, свидетельствующие о многосторонней физиологической значимости АФК как регуляторов различных аспектов клеточной активности.

С применением высокочувствительных методов хемилюминесценции и флуоресцентных зондов, а также перехватчиков АФК и ингибиторов различных ферментов нами установлено, что АФК являются промежуточными метаболитами практически всех клеток крови (лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов, тромбоцитов и др.). Так, способность лимфоцитов крови человека образовывать АФК была установлена впервые при их адгезии на стекло и стимуляции лектином конканавалином А (Кон А) [1, 2]. Образование АФК зарегистрировано в процессах формирования комплекса HLA-антител с HLA-антигенами на поверхности лимфоцитов и на основе этого предложен новый принцип определения параметров данной реакции [3]. Скорость образования АФК в лимфоцитах зависит от концентрации стимулирующих факторов, рН и температуры, а также состава среды инкубирования. Методом ингибиторного анализа установлено, что за образование АФК в лимфоцитах ответственны ферментные системы, находящиеся в плазматической мембране.

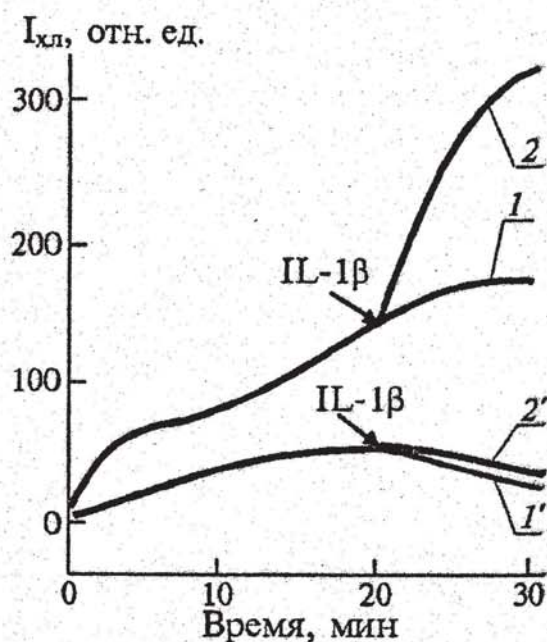


Рис. 1. Влияние рекомбинантного интерлейкина-1 β (rIL-1 β) на образование АФК в нейтрофилах при контакте клеток со стеклом.

В отсутствие (1, 1') и в присутствии rIL-1 β (2, 2'). (1' и 2' — в присутствии супероксиддисмутазы)

На рис. 1 показаны эффекты праймирования кислородактивирующей способности нейтрофилов цитокинами — рекомбинантным интерлейкином-1 β (rIL-1 β) и гранулоцит-колониестимулирующим фактором (G-CSF). Исследования показали, что в передаче сигнала от интерлейкина rIL-1 β через плазматическую мембрану к внутриклеточной миелопероксидазной системе участвуют АФК и, в частности, супероксидные анион-радикалы, выполняющие функцию вторичных мессенджеров [4, 5]. Согласно [6], rIL-1 β активирует в клетках глюкозонезависимый путь генерации АФК, связанный с метаболизмом арахидоновой кислоты.

Результаты, приведенные на рис. 2, свидетельствуют о том, что необходимым условием продукции АФК в нейтрофилах при действии rIL-1 β , G-CSF и индукторов эндоцитоза является клеточная адгезия. Моноциты так же, как и нейтрофилы, не образуют АФК в условиях, исключающих клеточную адгезию. Следовательно, продукция АФК с участием внутриклеточной миелопероксидазной системы моноцитов и нейтрофилов определяется

уровнем активирования редокс-систем плазматических мембран [7, 8]. Полученные результаты объясняют синергизм сочетанного влияния праймирующих агентов и стимуляторов функциональной активности клеток на процессы генерации АФК.

Детальное исследование механизмов образования АФК нейтрофилами и тимоидами при восстановлении менадиона показало, что в этом процессе принимают участие G-белки, цитохром Р-450 [9], системы метаболизма арахидоновой кислоты и транспорта глюкозы, ионы кальция [6]. Процесс генерации АФК моноцитами,

нейтрофилами и лимфоцитами взаимосвязан с такими реакциями клеток, как адгезия и агрегация клеток, усиление поглощения глюкозы, молекулярного кислорода, фагоцитоз в нейтрофилах и моноцитах, пролиферация лимфоцитов [6, 10], которые протекают на начальных и более поздних стадиях стимуляции их функциональной активности (рис. 3). Кислородактивирующие системы нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов участвуют в проявлении иммунодепрессивного действия вируса гриппа на начальных стадиях его взаимодействия с клетками [11, 12].

Пероксидазоподобные системы генерации АФК обнаружены в астроцитах и миксовирусах [13, 14]. Выявлена роль редокс-систем мембран эритроцитов в процессе гемолитической трансформации клеток. Установлено, что АФК вызывают окисление гемоглобина в растворе и в эритроцитах и участвуют в процессах окислительного и вирусного гемолиза эритроцитов [15, 16].

Индуктированная тромбином и арахидоновой кислотой хемилюминесценция тромбоцитов свидетельствует об образовании АФК в тромбоцитах при их активации [17]. Исследования показали, что генерация АФК в тромбин- и арахидонат-активированных тромбоцитах связана с активацией циклооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты.

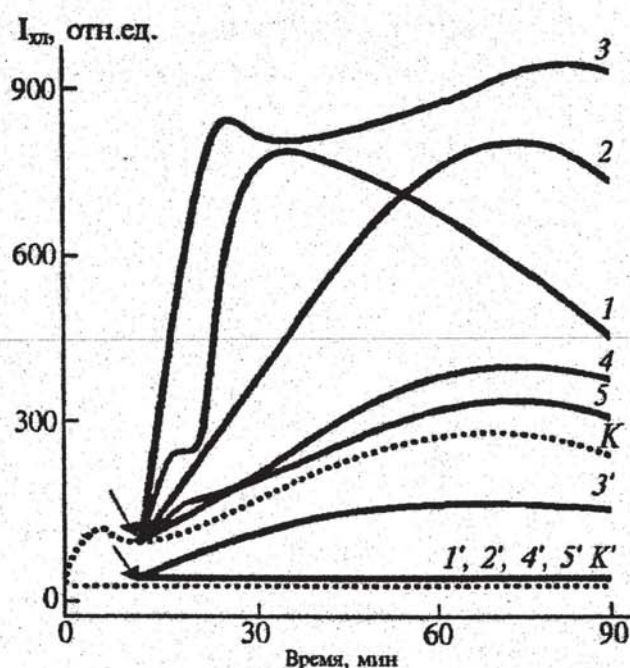


Рис. 2. Кинетические зависимости образования АФК в нейтрофилах при добавлении латекса (1, 1'), фитогеоматтинина (2, 2'), арахидоновой кислоты (3, 3'), интерлейкина-1 β (4, 4'), G-CSF (5, 5') при адгезии клеток к стеклу (1–5) и в отсутствие адгезии (1'–5'). К, К' – контроль в отсут твие индукторов АФК. Стрелкой указан момент добавления индукторов

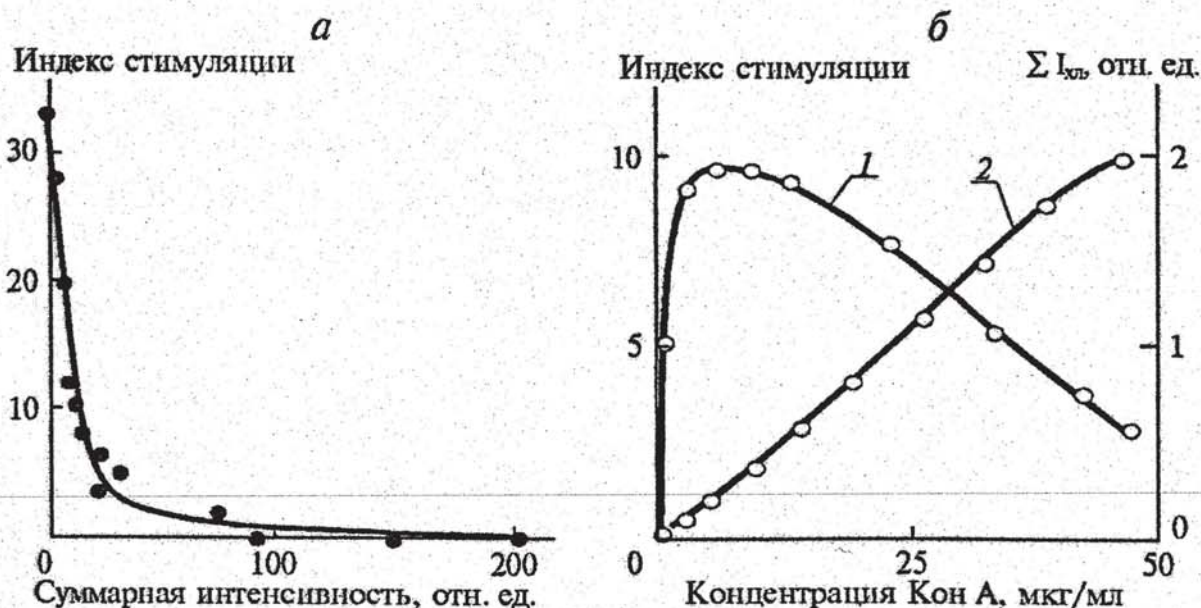


Рис. 3. Взаимосвязь между индексом стимуляции и суммарной интенсивностью люминисценции (ЛЗХЛ) лимфоцитов крови различных доноров при действии конканаваллина А (а) и их зависимость от концентрации конканаваллина А (б):

1 – индекс стимуляции, 2 – интенсивность ЛЗХЛ

АФК участвуют в регуляции функциональной активности тромбоцитов и оказывают двойственный эффект: они могут как увеличивать агрегационную активность тромбоцитов, так и ингибировать агрегацию тромбоцитов [18–20]. Нами установлено, что H_2O_2 индуцирует как агрегацию, так и дезагрегацию тромбоцитов (рис. 4). Данные ингибиторного анализа H_2O_2 -индуцированной агрегации тромбоцитов свидетельствуют о том, что H_2O_2 активирует циклооксигеназный путь метаболизма арахидоновой кислоты.

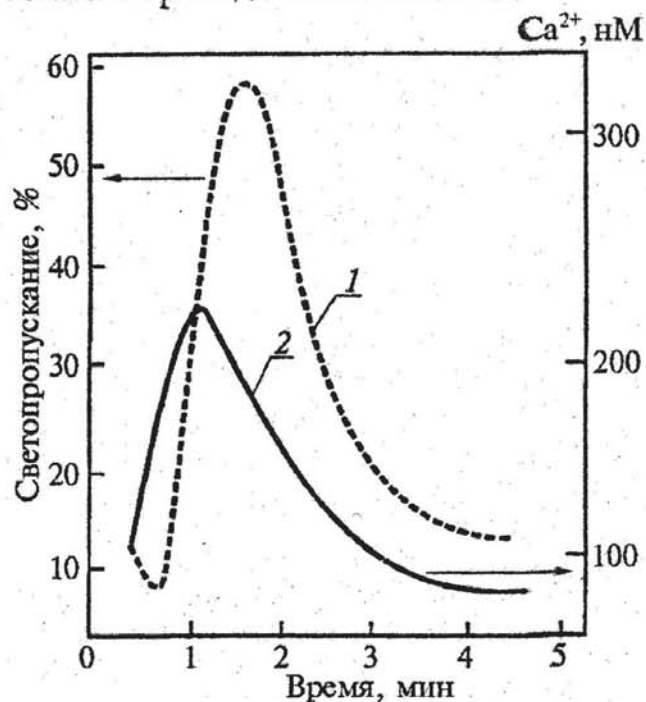


Рис. 4. Индуцированная перекисью водорода агрегация и дезагрегация тромбоцитов человека (1) и изменение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция (2)

Активация перекисью водорода сигнальных систем приводит к увеличению внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция за счет их входа через плазматическую мембрану из внешней среды и выхода из внутриклеточных депо (см. рис. 4). Результаты исследования свидетельствуют о том, что H_2O_2 также участвует в механизмах дезагрегации тромбоцитов. Проявляя дезагрегационную способность, H_2O_2 разрушает агрегаты, образовавшиеся под действием различных индукторов агрегации. Антиагрегационный эффект редокс-активных соединений менадиона и адриамицина опосредован действием АФК.

Способность клеток генерировать АФК была изучена при ряде иммунных патологий. Было обнаружено, что при панмиелопаatii, миелодиспластическом синдроме, лимфогранулематозе, нейтропении в онкогематологии, а также при воздействиях, вызывающих иммунопато-

логические состояния (действие ионизирующего излучения, миксовирусов), происходит селективное модифицирование кислородаактивирующих систем клеток [7, 21, 22].

Для миелосупрессивных больных наблюдалось потенцирование функциональной активности нейтрофилов при действии фактора G-CSF «Granocyte». У пациентов с неходжкинскими лимфомами, нейробластомой и острым лимфобластным лейкозом после курса интенсивной химиотерапии в состоянии нейтропении способность нейтрофилов периферической крови генерировать АФК при стимуляции к фагоцитозу снижалась по сравнению со здоровыми донорами. При индуцированном гранулоцитопозе у онкогематологических больных происходила модификация кислородаактивирующей способности нейтрофилов. На основании полученных данных разработан метод хемилюминесцентного мониторинга функциональной активности нейтрофилов у онкогематологических больных при выходе из состояния фебрильной нейтропении при использовании G-CSF [23].

Таким образом, представленные результаты позволяют заключить, что протекающие многих клеточных процессов происходит с участием АФК, которые выступают в качестве вторичных мессенджеров в меж- и внутриклеточной сигнализации при

агрегации, дезагрегации, адгезии и активации клеток агрегантами, лектинами, митогенами, цитокинами и т. д. При ряде патологий способность клеток генерировать АФК нарушается.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ АЗОТА И NO-СИНТАЗЫ

Роль активных форм азота (АФА) и NO-синтаз в механизмах регуляции функционального ответа клеток была установлена при исследовании тромбоцитов, нейтрофилов и опухолевых клеток [24–26]. Соединения, являющиеся донорами или предшественниками NO (нитрит натрия, нитроглицерин, нитропруссид и L-аргинин), ингибируют агрегационную активность тромбоцитов и активируют процессы, уменьшающие в цитоплазме концентрацию свободного внутриклеточного кальция. Разные доноры NO запускают различные внутриклеточные регуляторные механизмы. L-аргинин, в отличие от NaNO_2 , нитроглицерина и нитропрусида, не влияет на тромбин- и арахидонат-индуцированное увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , но отменяет тромбин-индуцированное увеличение цАМФ. Доноры NO в концентрациях, полностью блокирующих поступление ионов кальция в тромбоциты, лишь частично подавляют агрегацию тромбоцитов. Ca^{2+} -блокирующее действие является основным эффектом NO, генерируемого такими лекарствами, как нитроглицерин и нитропруссид.

Доноры NO в присутствии перекиси водорода или менадиона, активирующего образование АФК, индуцировали разрушение тромбоцитарных агрегатов, образовавшихся под действием тромбина – мощного индуктора агрегации. Полученные данные свидетельствуют о синергическом действии АФК и АФА на уровне процессов регуляции клеточной агрегации.

При изучении NO-синтазной активности в жидкости плевральных экссудатов на основе анализа содержания нитратов и нитритов, которые являются стабильными конечными продуктами химических превращений NO в организме, было установлено, что этот показатель у больных раком легкого существенно выше, чем у пациентов с плевритами [25]. Степень изменения NO-синтазной активности коррелировала с экспрессией эндогенных лектинов в клетках плевральных экссудатов, связывающих такие гликолиганды, как N-ацетил-D-глюкозамин и ганглиозид GM_1 . Изменение содержания нитратов и нитритов *in vivo* в узком диапазоне концентраций обеспечивало оптимальные уровни для лектин-индуцированной генерации H_2O_2 клетками плевральных экссудатов [26]. Нитраты и нитриты *in vitro* не оказывали существенного влияния на H_2O_2 -генерирующую активность клеток иммунной системы, тогда как нитропруссид натрия дозозависимо ингибировал эту реакцию. Полученные результаты свидетельствуют о наличии в организме новой сигнальной системы лектинзависимой регуляции клеточных функций, связанной с контролем процессов синтеза NO.

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

С применением методов светорассеяния, флуоресценции, спектрофотометрии и электронной микроскопии получены результаты, свидетельствующие о важной роли лиганд-рецепторных комплексов в механизмах активации клеток при действии

веществ, обладающих сродством к рецепторам плазматической мембраны. Согласно [27], сформированные лиганд-рецепторные структуры способны перемещаться на поверхности клеток в латеральной плоскости и участвовать в трансмембранном движении в обоих направлениях относительно клеточной поверхности. На начальных стадиях взаимодействия экзогенных лигандов с рецепторами наблюдается плейотропный характер мембранных реакций, ограниченных локальными участками плазматической мембраны. Конкретный тип перемещения лиганд-рецепторных комплексов определяется как индуцированными структурными изменениями в плазматической мембране, так и процессами внутриклеточной сигнализации. Возможность дифференциальной регуляции рецептор-опосредованных реакций клеток с участием редокс-систем плазматической мембраны и перераспределения ионов водорода в клетках показана в работах [28–31]. Движение рецепторных кластеров осуществляется путем активации эндоцитоза, шеддинга и/или фиксации агрегированных рецепторов на поверхности клеток [28, 32–35]. Тонкая регулировка движения лиганд-рецепторных комплексов протекает с участием цитоскелета, некоторых функциональных групп мембранных рецепторов и ряда ферментных систем, связанных с рецепторами плазматической мембраны. Анализ конкретных типов движения мембранных кластеров имеет теоретическое и прикладное значение для биологии и медицины.

В течение ряда лет нами проводилось систематическое и детальное исследование биологической активности лектинов различного происхождения [36, 37]. Актуальность данной проблемы определяется тем обстоятельством, что лектины являются новым типом модификаторов биологического ответа клеток, перспективным для использования в биомедицинских целях. Существенным отличительным свойством лектинов является возможность селективного и управляемого контроля их активности гаптенowymi углеводами. Лектинзависимая активация клеток рассматривается с точки зрения универсального характера белок-углеводных взаимодействий в регуляции клеточных функций и, прежде всего, участия низкомолекулярных вторичных мессенджеров в формировании адекватного ответа клеток. В этом отношении к настоящему времени нами установлены многие детали молекулярно-мембранных механизмов таких процессов, как активация клеток иммунной системы под действием эндогенных лектинов животных и человека [38], лектин-индуцированное образование устойчивых к действию гаптенowych углеводов (haptenic sugar resistant, HSR) межклеточных контактов [39–43], термоиндуцированный шеддинг мембранных гликопротеинов [32], межклеточная агрегация клеток иммунной системы и бактерий в суспензиях [44–46], дегрануляция [47, 48], генерация АФК фагоцитами [49].

Впервые был выявлен эндогенный галектин животного происхождения CL-16 (рис. 5), который *in vitro* оказался эффективным стимулятором НАДФН-оксидазной активности, дегрануляции и агрегации нейтрофилов человека, а также индуктором мобилизации внутриклеточного свободного кальция. Полученные данные свидетельствуют о важной физиологической роли галактозидспецифичных эндогенных лектинов животных и человека как активаторов клеток иммунной системы. Эта активность также присуща лектинам лекарственных растений, таких как омела белая и бузина черная [38, 42, 50, 51]. Результаты исследований, выполненных с

лектинами, являются фундаментальной основой для создания принципиально новых диагностических и терапевтических средств.

Лектинзависимая реактивность клеток (генерация H_2O_2 , агрегация) претерпевает существенные изменения в зависимости от степени и характера воздействия на клетки таких внешних факторов, избирательно модифицирующих рецепторные и функциональные компоненты клеточных сигнальных систем, как тепловой шок, УФ-облучение, оксиданты, протеолитические ингибиторы, сульфгидрильные и белок-сшивающие реагенты, что позволяет рассматривать лектины в качестве высокочувствительных индикаторов нарушений функциональной активности клеток [30, 32, 34, 45]. В качестве примера приведены данные об успешном применении лектиновых тестов для выявления термо- и фотоиндуцированной инактивации термолабильного компонента НАДФН-оксидазной системы нейтрофилов — белка p67-phox (рис. 6). Использование лектинов в цитоэкологических исследованиях представляется весьма перспективным направлением будущих практических разработок.

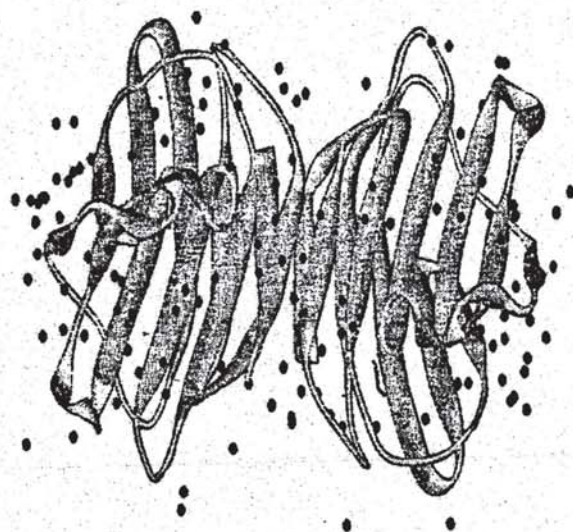


Рис. 5. Трехмерная структура галектина из печени цыплят CG-16, обладающего активирующим действием в отношении нейтрофилов человека (код PDB 1QMJ)

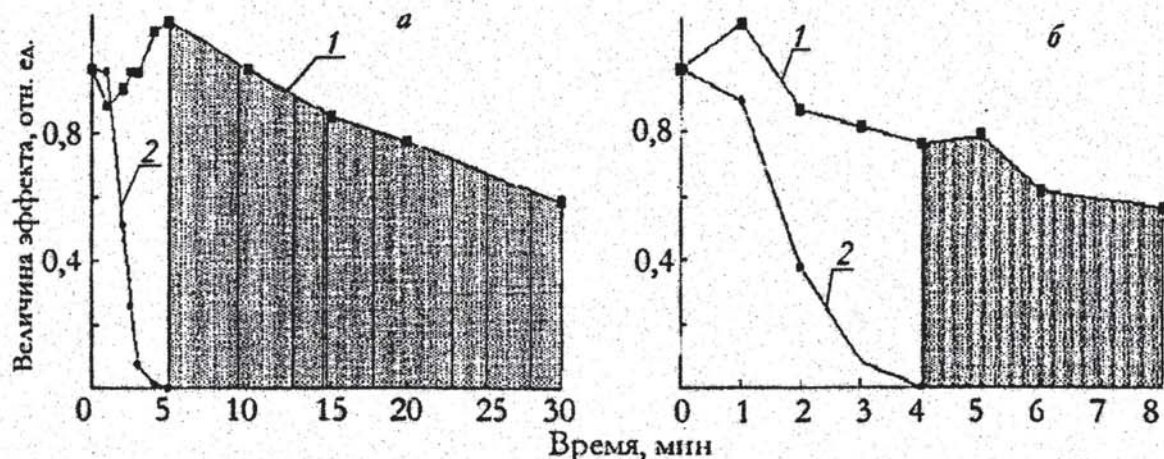


Рис. 6. Влияние теплового шока ($46^{\circ}C$) и УФ-облучения (254 нм , $2,4\text{ Вт/м}^2$) на скорость агрегации нейтрофилов человека (1) и генерацию H_2O_2 (2) при действии лектина *Phaseolus vulgaris* (50 мкг/мл) [55].

(По оси ординат — время термо- (а) или фото- (б) воздействия. Затрихованные участки соответствуют агрегации кластеров с инактивированным цитоплазматическим компонентом p67-phox.)

МЕХАНИЗМЫ АГРЕГАЦИИ КЛЕТОК

Большой объем исследований посвящен изучению механизмов формирования межклеточных контактов в процессах агрегации тромбоцитов, нейтрофилов и тимоцитов. Установлено, что в основе мембранных механизмов процессов межкле-

точной агрегации клеток-мишеней (нейтрофилы человека, тимоциты крыс) и бактерий *Escherichia coli* лежат маннозоспецифичные контакты, образование которых блокируется под действием бактерицидных факторов и селективных ингибиторов клеточного метаболизма [45]. На примере тимоцитов крыс показано, что формирование маннозоспецифических межклеточных контактов в различных температурных диапазонах зависит от природы лектина: обнаружено свойство обратимости процесса межклеточной агрегации в смешанной суспензии бактерий и тимоцитов при повторяющихся увеличении и уменьшении температуры как фактора, модулирующего структурное состояние адгезивных белков [46]. Для тромбоцитов человека также показана важность структурного состояния плазматической мембраны в регуляции процесса агрегации. В частности, выявлены физиологически значимые интервалы изменений pH, температуры и ионной силы среды, обеспечивающие оптимальную агрегационную активность тромбоцитов [52, 53]. Полученные результаты положены в основу нового метода выделения тромбоцитов, исключающего нежелательную стимуляцию клеток в процессе выделения [54].

Обнаружен новый тип межклеточных взаимодействий в процессах агрегации и дезагрегации тромбоцитов и нейтрофилов крови человека, а также тимоцитов крыс, определяемый состояниями тиол-зависимых редокс-систем [42, 56, 57]. Дезагрегация тромбоцитов, индуцированная тиоловым реагентом N-этилмалеимидом (NEM), показана на рис. 7. Указанный тип взаимодействий играет важную роль при лекарственном регулировании функционального отклика клеток. Обнаружен путь сигнальной трансдукции в тромбоцитах, не приводящий к увеличению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} при лектин-индуцированной агрегации, но

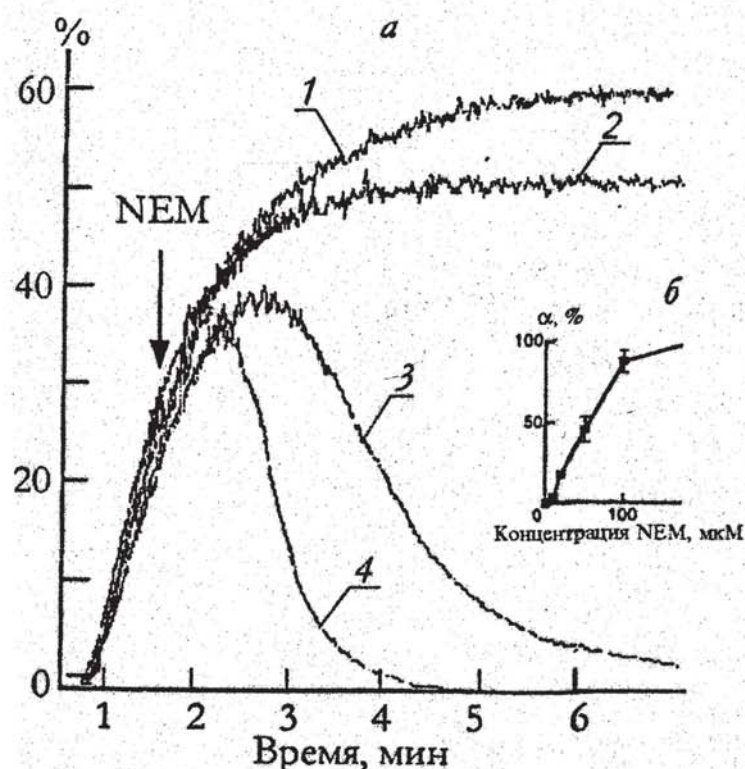


рис. 7. Дезагрегация тромбоцитов, индуцированная NEM, добавленным на 1 мин АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (а), и зависимость степени дезагрегации α от концентрации NEM (б) [56].

Концентрация NEM: 1 – 0 мкМ, 2 – 20 мкМ, 3 – 100 мкМ, 4 – 200 мкМ)

обеспечивающий прочную межклеточную адгезию [58]. Функциональным свойством соответствующих контактов является их резистентность в присутствии гаптенных углеводов, блокирующих лектиновую активность. Следует подчеркнуть, что индукция образования устойчивых к гаптенным углеводам HSR-контактов является новым функциональным откликом клеток на действие лектинов, выявляемым агрегационным методом [42]. Основным условием для экспрессии адгезионных рецепторов на поверхности клеток является активация процессов внутриклеточной сигнализации, которая зависит таким образом не только от свойств лектинов, но и типа эффекторных клеток [41]. С применением селективных ингибиторов системы вторичных мессенджеров предположены механизмы участия сигнальных систем клеток в форми-

ровании HSR-контактов, содержащих в качестве ключевых компонентов Ca^{2+} -зависимый путь, арахидонат-зависимый путь и p56^{Lck} тирозинкиназу [40, 41].

ИССЛЕДОВАНИЕ МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР

Молекулы фосфолипидов подвергаются окислению как АФК, так и молекулярным кислородом. Перекисное окисление липидов индуцирует структурную модификацию липидов в биологических и модельных мембранах [59–64]. В результате перекисного окисления липидов происходит образование хромоформных систем (рис. 8). При изучении электронных и колебательных спектров поглощения, флуоресценции, возбуждения флуоресценции и фосфоресценции, а также поляризации флуоресценции продуктов перекисного окисления фосфолипидов была установлена структура хромоформных систем и показано, что они представляют собой сопряженные полиеновые цепи различной длины. Изучена локализация и ориентация полиеновых хромофоров в бислойных мембранах. Показано, что под действием внешних физико-химических факторов, таких как температура, ультрафиолетовое излучение, ультразвук, озон, происходит деструкция хромоформных систем.

Исследование закономерностей протекания свободнорадикальных процессов в клеточных мембранах и модельных системах позволило установить образование кластерных структур и полимеризацию компонентов, приводящую к формированию в мембране пространственной полимерной сетки. Наблюдаемые эффекты приводят к модификации физико-химических свойств мембранных структур. Изменяются механическая устойчивость и электрическая проводимость мембран, их барьерные и транспортные функции. Обнаружено образование ионных каналов в бислойных липидных мембранах, связанное с наличием продуктов перекисного окисления липидов и их кластеризацией.

Исследования в данном направлении позволили разработать методику получения стабильных липосом. На основе спектроскопических свойств липидных хромофоров разработан метод изучения фазовых переходов и свободнорадикальных процессов в биомембранах. На основе данных скрининга хромоформных систем при различных структурных состояниях мембранного бислоя липидов разработан метод дифференциальной диагностики некоторых заболеваний крови (ИБС, атеросклероз и др.).

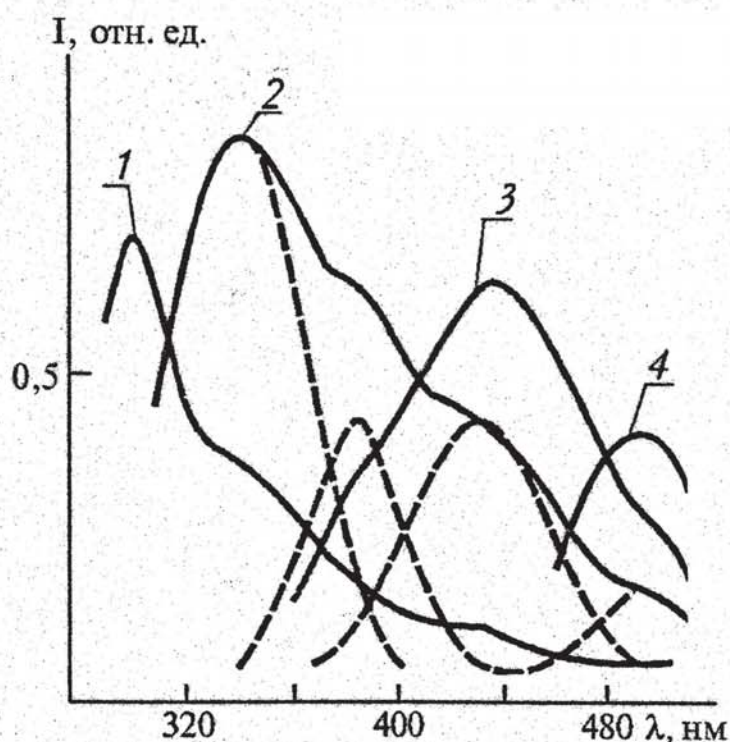


Рис. 8. Спектры флуоресценции фосфатидилхолина в хлороформе при различных длинах волны возбуждения ($\lambda_{\text{в}}$):

1 — $\lambda_{\text{в}}=270$ нм; 2 — $\lambda_{\text{в}}=310$ нм; 3 — $\lambda_{\text{в}}=360$ нм; 4 — $\lambda_{\text{в}}=450$ нм

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе обоснован ряд новых научных положений, среди которых в первую очередь можно назвать положения о сигнальной роли АФК в клетках, о синергическом участии активных форм кислорода и азота в регуляции клеточных процессов, об активации NO-синтаз при опухолевой трансформации клеток, о новых типах межклеточных взаимодействиях. Впервые обнаружены и охарактеризованы системы активации молекулярного кислорода в различных клетках, в том числе в лимфоцитах и моноцитах крови человека. Установлены новые типы межклеточных контактов и новые пути обработки информации в клетках. Полученные результаты создают основы использования установленных систем генерации активных низкомолекулярных метаболитов как новых молекулярно-мембранных мишеней для терапевтического воздействия при лечении ряда заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н., Левин В.И., Свирновский А.Н. // Иммунология. 1985. № 1. С. 79–80.
2. Семенкова Г.Н., Кедиц Г., Левин В.И. и др. // Биофизика. 1985. Т. 30, № 5. С. 921–922.
3. Семенкова Г.Н., Левин В.И., Черенкевич С.Н. и др. // Гематол. и трансфузиол. 1990. № 12. С. 20–23.
4. Закревская Ю.В., Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н. и др. // Докл. АН Беларуси. 1993. Т. 37, № 6. С. 79–81.
5. Закревская Ю.В., Семенкова Г.Н., Мурзенко П.П. и др. // Журн. эпидем., микробиол. и иммунол. 1994. № 4. С. 69–72.
6. Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н. // Фотобиология и мембранная биофизика / Под ред. П.Д. Вологовского. Мн., 1999. С. 209–220.
7. Smirnova E.I., Semenkov G.N., Kovalenko E.I. et al. // Acute Leukemias VII. 1998. P. 387–395.
8. Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н., Левин В.И., Свирновский А.Н. // Биофизика. 1985. Т. 30, № 5. С. 864–867.
9. Akhrem A.A., Semenkov G.N., Cherenkevich S.N. et al. // Biomed. Biochim. Acta. 1985. V. 44. P. 1591–1597.
10. Семенкова Г.Н., Коваленко Е.И., Закревская Ю.В., Черенкевич С.Н. // Укр. биохим. журн. 1994. Т. 66, № 6. С. 86–90.
11. Судник Ю.М., Клиггер Ю.Е., Семенкова Г.Н., Тилушенко А.В. // Новые подходы к химиотерапии вирусных инфекций. Рига, 1991. С. 79–86.
12. Грибкова Н.В., Судник Ю.М., Семенкова Г.Н. // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний. Мн., 1995. С. 244–248.
13. Судник Ю.М., Клиггер Ю.Е., Черенкевич С.Н. и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1985. № 12. С. 688–690.
14. Семенкова Г.Н., Квачева З.Б., Закревская Ю.В. и др. // Укр. биохим. журн. 1998. Т. 70, № 4. С. 126–130.
15. Судник Ю.М., Вотяков В.И., Семенкова Г.Н. и др. // Вопросы вирусологии. 1986. № 3. С. 354–357.
16. Чаранкевич С.М., Хмяльніцкі А.І., Ба А.С. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1987. № 3. С. 87–90.
17. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // Вопросы мед. химии. 1984. № 6. С. 12–14.

18. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // Гематол. и трансфузиол. 1988. Т. 33, № 11. С. 34–37.
19. Самаль А. Б., Черенкевич С. Н., Хмара Н. Ф. // Биохимия. 1990. Т. 55, № 5. С. 786–790.
20. Самаль А. Б., Зорина Т. Е., Черенкевич С. Н. // Гематол. и трансфузиол. 1990. Т. 36, № 4. С. 19–21.
21. Погирницкая А.В., Семенкова Г.Н., Зорин В.П. и др. // Эксперим. онкология. 1991. Т. 13, № 4. С. 51–54.
22. Семенкова Г.Н., Казарезова Т.И., Черенкевич С.Н. // Состояние гематоиммунной системы у детей Беларуси после катастрофы на ЧАЭС. Мн., 1996. С. 107–115.
23. Semenkov G.N., Smirnova E.I., Kovalenko E.I. et al. // Exp. Oncology. 1997. V. 19, № 2. P. 153–157.
24. Samal A.B., Karvatskaya O.D., Loiko E.N. // Acta. Physiol. Scand. 1999. V. 167. P. 40.
25. Timoshenko A.V., Kayser K., Kaltner H. et al. // Lung Cancer. 1996. V. 14. P. 75–84.
26. Timoshenko A.V., Dubovskaya L.V., Karvatskaya O.D. et al. // Int. J. Oncol. 1999. V. 14, № 4. P. 793–798.
27. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. // Успехи совр. биол. 1990. Т. 109, № 2. С. 206–218.
28. Зорин В.П., Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. // Цитология. 1985. Т. 27, № 6. С. 713–717.
29. Тимошенко А.В., Зорин В.П., Черенкевич С.Н. // Биофизика. 1984. Т. 29, № 3. С. 499–500.
30. Тимошенко А.В., Зорин В.П., Черенкевич С.Н. // Укр. биохим. журн. 1988. Т. 60, № 1. С. 41–46.
31. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н., Самаль А.Б. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2. 1986. № 3. С. 47–50.
32. Тимошенко А.В., Горудко И.В., Камано С.С., Черенкевич С.Н. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2. 1990. № 1. С. 34–36.
33. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. // Биополимеры и клетка. 1989. Т. 5, № 6. С. 78–82.
34. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. // Эксперим. онкология. 1990. Т. 12, № 3. С. 63–65.
35. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. // Биофизика. 1987. Т. 32, № 3. С. 434–437.
36. Тимошенко А.В. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2. 1997. № 2. С. 38–47.
37. Тимошенко А.В. // Мед. новости (Минск). 1997. № 4. С. 16–20.
38. Timoshenko A.V., André S., Kaltner H. et al. // Biosci. Rep. 1997. V. 17, № 2. P. 219–230.
39. Timoshenko A.V., Gorudko I.V., Kaltner H. et al. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. V. 43, № 3. P. 477–487.
40. Timoshenko A.V., Gorudko I.V., Kaltner H., Gabius H.-J. // Mol. Cell. Biochem. 1999. V. 197. № 1, 2. P. 137–145.
41. Timoshenko A.V., Gorudko I.V., Cherenkevich S.N., Gabius H.-J. // FEBS Lett. 1999. V. 449. P. 75–78.
42. Горудко И.В., Тимошенко А.В. // Биохимия. 2000. Т. 65, № 8. С. 1107–1113.
43. Samal A.B., Timoshenko A.V., Loiko E.N. et al. // Biochemistry. 1998. V. 63, № 5. P. 516–522.
44. Тимошенко А.В., Фомичев А.Ю., Черенкевич С.Н. // Молек. генетика. 1994. № 1. С. 9–16.
45. Тимошенко А.В., Герасимова А.К., Колупаева Л.И., Черенкевич С.Н. // Биополимеры и клетка. 1991. Т. 7, № 3. С. 98–102.
46. Timoshenko A.V., Gerasimova L.K., Kolupaeva L.I., Cherenkevich S.N. // Биополимеры и клетка. 1994. Т. 10, № 1. С. 58–66.
47. Timoshenko A.V., Kayser K., Drings P., et al. // Res. Exp. Med. 1995. V. 195. P. 153–162.

48. Gorudko I.V., Timoshenko A.V., Timoshenko A.P. et al. // Central East. Eur. J. Oto-Rhino-Laryngol. Head Neck Surg. 1997. V. 2. № 1/2. P. 22–27.
49. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. // Биополимеры и клетка. 1994. Т. 10, № 1. С. 58–66.
50. Timoshenko A.V., Cherenkevich S.N., Gabius H.-J. // Biomed. Pharmacother. 1995. V. 49. P. 153–158.
51. Timoshenko A.V., Gabius H.-J. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1993. V. 374, № 4. P. 237–243.
52. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // Цитология. 1983. Т. 25, № 7. С. 845–849.
53. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // Биофизика. 1989. Т. 34, № 2. С. 267–271.
54. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизм. Мн., 1990.
55. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. // Гематол. и трансфузиол. 1995. Т. 40, № 4. С. 32–35.
56. Самаль А.Б., Лойко Е.Н. // Биохимия. 2000. Т. 65, № 2. С. 276–283.
57. Timoshenko A.V., Gorudko I.V., André S., Gabius H.-J. // Biosci. Rep. 2000. V. 20, № 3. P. 199–209.
58. Самаль А.Б., Тимошенко А.В., Лойко Е.Н. и др. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 5. С. 611–619.
59. Луневич А.Я., Хмельницкий А.И., Черенкевич С.Н. и др. // Биофизика. 1983. Т. 28. № 2. С. 238–241.
60. Володько Л.В., Хмельницкий А.И., Черенкевич С.Н. // ЖПС. 1979. Т. 31. № 1. С. 70–73.
61. Луневич А.Я., Хмельницькі А.І., Чаранкевіч С. М., Камяк А.І. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1984. № 3. С. 70–73.
62. Хмельницкий А.И., Черенкевич С.Н. // Биофизика. 1982. Т. 27, № 3. С. 550–552.
63. Хмельницкий А.И., Черенкевич С.Н. // ЖПС. 1980. Т. 32, № 5. С. 857–859.
64. Хмельницкий А. И., Черенкевич С. Н., Камяк А.И., Минько А.А. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 1. 1982. № 3. С. 16–18.

References

Литература

1. Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н., Левин В.И., Свирновский А.И. // Иммунология. 1985. № 1. С. 79-80.
2. Семенкова Г.Н., Кедиц Г., Левин В.И. и др. // Биофизика. 1985. Т. 30, № 5. С. 921-922.
3. Семенкова Г.Н., Левин В.И., Черенкевич С.Н. и др. // Гематол. и трансфузиол. 1990. № 12.- С. 20-23.
4. Закревская Ю.В., Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н. и др. // Докл. АН Беларуси.- 1993. Т. 37, № 6. С. 79-81.
5. Закревская Ю.В., Семенкова Г.Н., Мурзенко П.П. и др. // Журн. эпидем., микробиол. и иммунол. 1994. № 4. С. 69-72.
6. Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н. // Фотобиология и мембранная биофизика / Под ред. И.Д. Волотовского. Мн., 1999. С. 209-220.
7. Smirnova E.I., Semenkov G.N., Kovalenko E.I. et al. // Acute Leukemias VII. 1998. P. 387-395.
8. Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н., Левин В.И., Свирновский А.И. // Биофизика. 1985. Т. 30, № 5. С.864-867.
9. Akhrem A.A., Semenkov G.N., Cherenkevich S.N. et al. // Biomed. Biochim. Acta. 1985. V. 44. P. 1591-1597.
10. Семенкова Г.Н., Коваленко Е.И., Закревская Ю.В., Черенкевич С.Н. // Укр. биохим. журн. 1994. Т. 66, № 6. С. 86-90.
11. Судник Ю.М., Клиnger Ю.Е., Семенкова Г.Н., Тимошенко А.В. Процессы оксидоредукции на начальных стадиях взаимодействия вируса гриппа с клетками // Новые подходы к химиотерапии вирусных инфекций. Рига, 1991. С. 79-86.
12. Грибкова Н.В., Судник Ю.М., Семенкова Г.Н. // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний. Мн., 1995. С. 244-248.
13. Судник Ю.М., Клиnger Ю.Е., Черенкевич С.Н. и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1985. № 12. С. 688-690.

14. Семенова Г.Н., Квачева З.Б., Закревская Ю.В. и др. // Укр. биохим. журн. 1998. Т. 70, № 4. С. 126-130.
15. Судник Ю.М., Вотяков В.И., Семенова Г.Н. и др. // Вопросы вирусологии. 1986. № 3. С. 354-357.
16. Чаранкевіч С.М., Хмяльніцкі А.І., Ба А.С. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1987. № 3. С. 87-90.
17. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // Вопросы мед. химии. 1984. № 6. С. 12-14.
18. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // Гематол. и трансфузиол. 1988. Т. 33, № 11.- С. 34-37.
19. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // Биохимия. 1990. Т. 55, № 5. С. 786-790.
20. Самаль А.Б., Зорина Т.Е., Черенкевич С.Н. // Гематол. и трансфузиол. 1990. Т. 36, № 4. С. 19-21.
21. Погирницкая А.В., Семенова Г.Н., Зорин В.П. и др. // Эксперим. онкология. 1991. Т. 13, № 4. С. 51-54.
22. Семенова Г.Н., Казарезова Т.И., Черенкевич С.Н. // Состояние гематоиммунной системы у детей Беларуси после катастрофы на ЧАЭС. Мн., 1996. С. 107-115.
23. Semenkov G.N., Smirnova E.I., Kovalenko E.I. et al. // Exp. Oncology. 1997. V. 19, N 2. P. 153-157.
24. Samal A.B., Karvatskaya O.D., Loiko E.N. // Acta Physiol. Scand. 1999. V. 167. P. 40.
25. Timoshenko A.V., Kayser K., Kaltner H. et al. Binding capacities of two immunomodulatory lectins, carrier-immobilized glycoligands and steroid hormones in lung cancer and the concentration of nitrite/nitrate in pleural effusions // Lung Cancer. 1996. V. 14. P. 75-84.
26. Timoshenko A.V., Dubovskaya L.V., Karvatskaya O.D. et al. NO-dependent regulation of lectin- and menadione-induced H₂O₂ production by cells from pleural effusions of lung cancer patients and by immune cells // Int. J. Oncol. 1999. V. 14, N 4. P. 793-798.
27. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. Кластеры мембранных рецепторов и их движение в клетках // Успехи совр. биол. 1990. Т. 109, Вып. 2. С. 206-218.

28. Зорин В.П., Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. Изменение активности ионов водорода в лимфоцитах при эндоцитозе конканавалина А // Цитология. 1985. Т. 27, № 6. С. 713-717.

29. Тимошенко А.В., Зорин В.П., Черенкевич С.Н. Влияние конканавалина А на внутриклеточную величину рН тимоцитов // Биофизика. 1984. Т. 29, Вып. 3. С. 499-500.

30. Тимошенко А.В., Зорин В.П., Черенкевич С.Н. Влияние конканавалина А на содержание сульфгидрильных групп в тимоцитах // Укр. биохим. журн. 1988. Т. 60, № 1. С. 41-46.

31. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н., Самаль А.Б. Роль активных форм кислорода в конканавалин А-индуцированной агглютинации лимфоцитов // Вестн. Белорус. ун-та. Сер.2, хим., биол., географ. 1986. № 3. С. 47-50.

32. Тимошенко А.В., Горудко И.В., Камано С.С., Черенкевич С.Н. Термоиндуцированный шеддинг мембранных гликопротеинов // Вестн. Белорус. ун-та. Сер.2, хим., биол., географ. 1990. № 1. С. 34-36.

33. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. Агглютинация тимоцитов крыс, вызванная агрегированным конканавалином А // Биополимеры и клетка. 1989. Т. 5, № 6. С. 78-82.

34. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. Влияние гипертермии на некоторые свойства мембран клеток HeLa // Эксперим. онкология. 1990. Т. 12, № 3. С. 63-65.

35. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. Ингибирующее действие перехватчиков активных форм кислорода на эндоцитоз конканавалина А лимфоцитами // Биофизика. 1987. Т. 32, Вып. 3. С. 434-437.

36. Тимошенко А.В. Гликобиология и биомедицинское применение лектинов // Вестн. Белорус. Ун-та. Сер. 2, хим., биол., географ. 1997. № 2. С. 38-47.

37. Тимошенко А.В. Применение эндогенных лектинов в клинической диагностике // Мед. новости (Минск). 1997. № 4. С. 16-20.

38. Timoshenko A.V., André S., Kaltner H. et al. Generation of H₂O₂ by human neutrophils and changes of cytosolic Ca²⁺ and pH of

rat thymocytes in response to galactoside-binding proteins (lectins or immunoglobulins) // Biosci. Rep. 1997. V. 17, N 2. P. 219-230.

39. Timoshenko A.V., Gorudko I.V., Kaltner H. et al. Metabolic inhibitors as tools to delineate participation of distinct intracellular pathways in enhancement of lactose-induced dissociation of neutrophil and thymocyte aggregates formed by a plant lectin // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. V. 43, N 3. P. 477-487.

40. Timoshenko A.V., Gorudko I.V., Kaltner H., Gabius H.-J. Dissection of the impact of various intracellular signaling pathways on stable cell aggregate formation of rat thymocytes after initial lectin-dependent cell association using a plant lectin as model and target-selective inhibitors // Mol. Cell. Biochem. 1999. V. 197, N 1&2. P. 137-145.

41. Timoshenko A.V., Gorudko I.V., Cherenkevich S.N., Gabius H.-J. Differential potency of two crosslinking plant lectins to induce formation of haptenic-sugar-resistant aggregates of rat thymocytes by post-binding signaling // FEBS Lett. 1999. V. 449. P. 75-78.

42. Горудко И.В., Тимошенко А.В. Действие сигнальных ингибиторов на выход лизоцима из нейтрофилов человека, активированных лектином из коры бузины черной (*Sambucus nigra*) // Биохимия. 2000. Т. 65, № 8. С. 1107-1113.

43. Samal A.B., Timoshenko A.V., Loiko E.N. et al. Formation of lactose-resistant aggregates of human platelets induced by the mistletoe lectin and differential signaling responses to cell contact formation by the lectin or thrombin // Biochemistry (Mosc). 1998. V. 63, N 5. С. 516-22.

44. Тимошенко А.В., Фомичев А.Ю., Черенкевич С.Н. Влияние метаболических ингибиторов на устойчивость маннозоспецифических контактов *Escherichia coli* K12 и нейтрофилов человека // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1994. № 5. С. 9-13.

45. Тимошенко А.В., Герасимова Л.К., Колупаева Л.И., Черенкевич С.Н. Межклеточная агрегация тимоцитов и бактериальных клеток *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка. 1991. Т. 7, № 3. С. 98-102.

46. Timoshenko A.V., Gerasimova L.K., Kolupaeva L.I., Cherenkevich S.N. Mannose-specific intercellular aggregation of rat thymocytes and Escherichia coli triggered by temperature // Биополимеры и клетка. 1994. Т. 10, № 1. С. 58-66.

47. Timoshenko A.V., Kayser K., Drings P. et al. Carbohydrate-binding proteins (plant/human lectins and autoantibodies from human serum) as mediators of release of lysozyme, elastase, and myeloperoxidase from human neutrophils // Res. Exp. Med. 1995. V. 195. P. 153-162.

48. Gorudko I.V., Timoshenko A.V., Timoshenko A.P. et al. Lectin-induced degranulation of neutrophils from patients with ENT diseases // Central East. Eur. J. Oto-Rhino-Laryngol. Head Neck Surg. 1997. V. 2, N 1/2. P. 22-27.

49. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. Гликобиологические аспекты активации дыхательной цепи фагоцитов // Биополимеры и клетка. 1994. Т. 10, № 1. С. 58-66.

50. Timoshenko A.V., Cherenkevich S.N., Gabius H.-J. Viscum album agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function // Biomed. Pharmacother. 1995. V. 49. P. 153-158.

51. Timoshenko A.V., Gabius H.-J. Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside-specific lectin from Viscum album // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1993. V. 374, N 4. P. 237-243.

52. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // Цитология. 1983. Т. 25, № 7. С. 845-849.

53. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // Биофизика. 1989. Т. 34, № 2. С. 267-271.

54. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизм. Мн., 1990.

55. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. Генерация H_2O_2 и агрегация нейтрофилов человека под действием лектинов // Гематология и трансфузиология. 1995. Т. 40, № 4. С. 32-35.

56. Самаль А.Б., Лойко Е.Н. // Биохимия. 2000. Т. 65, № 2. С. 276-283.

57. Timoshenko A.V., Gorudko I.V., André S., Gabius H.-J. Cell-type dependence of stability modulation of lectin-initiated contacts by impairment of multivalent carbohydrate binding and intracellular signaling // Biosci. Reports. 2000. V. 20, N 3. P. 199-209.

58. Самаль А.Б., Тимошенко А.В., Лойко Е.Н. и др. Образование лактозорезистентных агрегатов тромбоцитов под действием лектина омелы и различные сигнальные ответы клеток на лектин и тромбин // Биохимия. 1998. Т. 63, № 5. С. 611-619.

59. Луневич А.Я., Хмельницкий А.И., Черенкевич С.Н. и др. // Биофизика. 1983. Т. 28, № 2. С. 238-241.

60. Володько А.В., Хмельницкий А.И., Черенкевич С.Н. // ЖПС. 1979. Т. 31, № 1. С. 70-73.

61. Луневіч А.Я., Хмяльніцкі А.І., Чаранкевіч С.М., Камяк А.І. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1984. № 3. С. 70-73.

62. Хмельницкий А.И., Черенкевич С.Н. // Биофизика. 1982. Т. 27, № 3. С. 550-552.

63. Хмельницкий А.И., Черенкевич С.Н. // ЖПС. 1980. Т. 32, № 5. С. 857-859.

64. Хмельницкий А.И., Черенкевич С.Н., Комяк А.И., Минько А.А. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 1. 1982. № 3. С. 16-18.