

грамме имели некоторые преимущества. Так 15,63% из них за все годы обучения сохранили 1 группу здоровья, тогда как в параллельном классе таких детей не было вообще. Меньшим во все годы обучения в этом классе было и количество часто и длительно болеющих детей. Особенно заметной разницей была в первом (1А – 18,75%; 1Б – 32,21%), шестом (6А – 18,75%; 6Б – 29,03%) и 9 классах (9А – 9,38%; 9Б – 19,35%).

Для того, чтобы составить представление о функциональном состоянии иммунокомпетентных клеток изучена активность ферментов цикла трикарбоновых кислот – сукцинатдегидрогеназы, в значительной степени отражающей уровень энергопродукции лимфоцитов.

При поступлении существенные различия активности фермента в обследованных классах отсутствовали. С первого по пятый класс активность СДГ у детей класса с развивающей программой была достоверно выше, чем в параллельном классе, что может свидетельствовать о повышенном напряжении. В 8 классе различия нивелировались и сохранялись на таком уровне до 11 класса.

У часто и длительно болеющих детей в обоих классах активность СДГ была, как правило, сниженной и лишь у отдельных из них выявлялись высокие показатели связанные с заболеванием бронхиальной астмой, недавно перенесенной крупозной пневмонией или острым отитом. У этих детей оказалась повышенной и активность кислой фосфатазы, а также нередко и содержание в клетках КА и серотонина.

Таким образом, анализ полученных данных позволяет заключить, что повышенные учебные нагрузки лишь умеренно усиливают испытываемый детьми стресс, связанный с началом учебы, а затем с переходом на предметное обучение.

Это не приводит к значительному увеличению заболеваемости, а также к нарушениям физического и биологического развития, тем более, что в классе с развивающим обучением дисгармоничность развития связана в основном с повышением роста или веса, в параллельном же классе с их снижением.

У здоровых детей подобный эффект можно расценить как тренирующий и лишь ослабленным или невротизированным детям развивающие программы рекомендовать не следует.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ИЗУЧЕНИИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА

Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т.,
Казимирский А.Н., Татарин Ю.С.

*Кафедра биохимии Российского
государственного медицинского университета,
Москва*

Альфа-фетопроtein (АФП) – основной эмбриоспецифический белок млекопитающих. По химической структуре АФП является гликопротеином с молекулярной массой 68-73 кД, имеющим трехдоменную пространственную организацию с характерным расположением 15 дисульфидных связей. Домены АФП имеют сходную альфа-спиральную вторичную структуру, однако отличаются параметрами третичной

структуры. Домены I и III имеют жесткую, компактно упакованную третичную структуру и связаны между собой протеолитически лабильным, гибким доменом II, конформация которого соответствует форме расплавленной глобулы. Несмотря на стабильность в растворе, АФП обладает достаточной конформационной подвижностью и изменяет конформацию под воздействием различных факторов, таких как высокие концентрации эстрогенов и жирных кислот, изменение pH среды и др. Изменение конформации молекулы сопровождается изменением антигенных и функциональных свойств АФП. Предполагается, что в нативной молекуле АФП часть биологически активных участков скрыты внутри белковой глобулы, которые выявляются, становясь доступными для взаимодействия, лишь при изменениях конформации молекулы.

Трехмерная (3D) структура АФП не известна, в связи с трудностями, возникающими при кристаллизации АФП. Пока не выяснена пространственная организация функционально-важных участков АФП, остаются не изученными механизмы укладки и силы, вызывающие сворачивание и разворачивание белковой глобулы АФП. Решению этих задач способствуют интенсивно развивающиеся в последнее время методы компьютерного моделирования. Наличие достаточно высокой степени сходства (39% идентичности) между аминокислотными последовательностями АФП и сывороточного альбумина (СА), для которого 3D структура установлена с помощью рентгеноструктурного анализа, предоставляет возможность для компьютерного построения модели пространственной структуры АФП на основе гомологии. Для моделирования на основе гомологии важным является то обстоятельство, что трехмерная структура (способ укладки) гомологичных белков (в данном случае АФП и СА) является в большей степени консервативной, чем их первичная структура. В базе данных PDB (protein data bank) нами было обнаружено 24 варианта 3D структуры СА человека. Из них для построения модели с использованием программы MODELLER были отобраны шесть 3D структур (1A06, 1BM0, 1E7A, 1GNI, 1HA2, 1UOR), которые были получены с высокой степенью разрешения (менее 3.0Å) и отличались друг от друга наличием или отсутствием в своем составе лиганда. Построенные пространственные структуры АФП были оптимизированы с привлечением экспериментальных данных, оценены и проанализированы, включая расчет элементов вторичной структуры и расположение биологически активных участков.

В настоящее время в составе АФП выявлен ряд участков с подтвержденной или предполагаемой биологической активностью: участки связывания эстрогенов, жирных кислот и билирубина, пептид, ингибирующий рост (GIP), мотивы гетеро- и гомодимеризации и др. Выявленный нами в составе АФП человека гептапептид LDSYQCT (АФП₁₄₋₂₀) обладает иммуномодулирующими свойствами. С использованием метода молекулярной динамики (МД) нами изучаются конформационно-динамические свойства данного пептида и его аналогов, а также сконструирована модельная система и изучается взаимодействие эстрогенсвязывающих пептидов АФП с 17β-эстрадиолом.

Метод МД основан на расчете классических (ньютоновских) траекторий движения молекулы в фазовом пространстве координат и импульсов ее атомов, и позволяет провести детальный (микроскопический) анализ конформационно-динамических процессов, происходящих в макромолекуле. Результаты анализа (данные о структуре и межмолекулярных взаимодействиях) можно сравнивать с экспериментальными измеримыми величинами, а также получать информацию о параметрах, которые трудно определить экспериментальными способами. Метод МД обеспечивает новым подходом к пониманию архитектуры и динамических свойств АФП и его пептидов, а также механизма их функционирования.

Ещё одним перспективным подходом, применяемым в исследованиях белков, является использование методов биоинформатики. С использованием программы ClustalW (версия 1.82) и баз данных первичных структур белков Swiss-Prot и TrEMBL нами проведено попарное и множественное выравнивание последовательностей белков семейства альбуминоидных генов, к которому, наряду с СА, афамином и витамин Д-связывающим белком, принадлежит АФП. На основе полученных данных осуществлен анализ филогенетических взаимоотношений этих белков и консервативных аминокислотных остатков в функционально активных участках, что может оказаться важным для понимания взаимосвязи структуры и функции не только АФП, но и других белковых молекул.

ПЕПТИД АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА (АФП₁₄₋₂₀) ВЫЗЫВАЕТ АПОПТОЗ CD95⁺-ЛИМФОЦИТОВ

Терентьев А.А., Порядин Г.В.,
Салмаси Ж.М., Александрова И.А.,
Тагирова А.К., Молдогазиева Н.Т., Казимирский А.Н.
*Российский Государственный
Медицинский Университет,
Москва*

Альфа-фетопротеин человека (АФП) включен во многие процессы, связанные с ростом и клеточной дифференцировкой. Препараты АФП обладают биологической, в том числе иммуносупрессорной, активностью и успешно применяются как лечебные препараты (Черешнев В.А. и соавт., 2000, 2002, 2004) для лечения различных заболеваний с хорошим терапевтическим эффектом.

Состояние иммунологической толерантности во многом определяется вхождением в апоптоз (программированную клеточную гибель) активированных лимфоцитов. Наиболее естественный путь удаления из организма активированных лимфоцитов способных к синтезу и секреции провоспалительных цитокинов это путь их активационного апоптоза. Активационный апоптоз лимфоцитов развивается как естественное завершение активационного (дифференцировочного) процесса в ходе, которого на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются рецепторы CD25, CD71, HLA-DR и CD95. CD95 – маркер готовности лимфоцитов к запуску активационного апоптоза. Система взаимодействующих рецепторов

Fas(CD95) и FasL(CD178) – важнейший механизм активационной элиминации лимфоцитов, благодаря включению которого удаляется большинство лимфоцитов после выполнения ими возложенный на них функций.

Продукты спонтанной протеолитической деградации АФП оказывают регулирующее влияние на иммунную систему человека, за счет пептидов из АФП возможно осуществляется контроль за иммунологической толерантностью. В этом плане интерес представляет идентификация активных участков в структуре АФП, обладающих иммунорегуляторной активностью, определение их структуры с последующим синтезом и проверкой биологической активности.

Цель исследования состояла в определении влияния синтетического фрагмента АФП₁₄₋₂₀ на экспрессию активационных рецепторов лимфоцитов, также определения апоптоза лимфоцитов у больных atopической бронхиальной астмой.

Методы исследования. Объектом исследования служили лимфоциты периферической крови больных atopической бронхиальной астмой – 7 пациентов, а также лимфоциты здоровых доноров (20 испытуемых). В период обострения заболевания, как можно судить по результатам многих исследований, лимфоциты характеризуются недостаточностью активационного апоптоза. Экспрессию рецепторов лимфоцитов определяли используя метод непрямой иммунофлюоресценции. Культивирование лимфоцитов проводили в стерильных условиях в минимальной среде 199 в атмосфере 5% CO₂ в течение 16 ч при температуре 37°. Концентрация клеток в среде инкубации составляла 2,5 млн/мл. К культивируемым лимфоцитам добавляли синтетический пептид АФП₁₄₋₂₀ (в конечной концентрации 10⁻⁸М). Для определения апоптоза лимфоцитов клетки окрашивали пропидий иодидом. Для повышения проницаемости клеточных мембран для пропидий иодида использовали дигитонин, обеспечивающий высокую проницаемость всех клеточных мембран.

Результаты исследования. Влияние пептида АФП₁₄₋₂₀ на лимфоциты, активированные воспалительным процессом у больных atopической бронхиальной астмой, наиболее выражено для двух поверхностных рецепторов – HLA-DR и CD95. Количество HLA-DR⁺-лимфоцитов под влиянием пептида снижалось, а количество CD95⁺-лимфоцитов достоверно увеличивалось. Уменьшение количества зрелых клеток (HLA-DR⁺-лимфоцитов) может быть объяснено ускорением их вхождения в апоптоз. Определение апоптоза под влиянием пептида среди CD95⁺-лимфоцитов показывает, что этот уровень изменяется с 31,51±3,16% у больных до 64,30±5,66%, p<0,001 после обработки пептидом. Вместе с тем, уровень апоптоза у здоровых доноров среди CD95⁺-лимфоцитов составляет не менее 90%.

Заключение. Изучаемый пептид АФП₁₄₋₂₀ влияет на активационный процесс в лимфоцитах путем увеличения экспрессии рецептора запуска активационного апоптоза CD95, повышает апоптоз среди CD95⁺-лимфоцитов и ведет к снижению количества зрелых HLA-DR⁺-клеток, количество которых аномально по-