

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СИНТЕЗА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ МАКРОМОНОМЕРОВ МЕТОДОМ
РАДИОАКТИВНЫХ ИНДИКАТОРОВ

Усова А. В., Чупов В. В., Валуев Л. И., Лыс Я. И.,
Федосеев В. М., Плате Н. А.

Макромономеры на основе высокомолекулярных физиологически активных веществ (**ФАВ**) в последние годы нашли широкое применение для создания синтетических полимерных материалов с требуемым комплексом физико-механических и биохимических свойств. К таким материалам в первую очередь относятся биоспецифические сорбенты, макромолекулярные терапевтические средства, гемосовместимые полимеры и т. п. [1]. В работах [1, 2] показано, что для решения ряда медицинских и биотехнологических задач наиболее пригодными оказываются материалы и вещества, содержащие не одно, а несколько химически связанных ФАВ, способных оказывать комбинированное воздействие на контактирующие с ними биологические системы. С точки зрения расширения спектра такого воздействия, т. е. создания материалов и изделий, более полно моделирующих функции отдельных тканей и даже органов живого организма, еще более перспективным представляется использование не индивидуальных ФАВ или их смесей, а целых клеток, предварительно активированных введением в их состав реакционноспособных связей (естественно, если это не сказывается на жизнеспособности таких клеток). Изучение механизма синтеза таких «супермакромономеров», т. е. нахождение мест активации, с помощью обычно применяемых для этих целей методов крайне затруднительно из-за чрезвычайно сложной и многоуровневой организации самой клетки.

В связи с этим цель настоящей работы — изучение возможности применения метода радиоактивных индикаторов для исследования процесса синтеза таких необычных макромономеров.

В работе использовали клетки морских люминесцентных бактерий (**КМЛБ**) *Photobacterium fischeri*, штамм 6 [3], взятые в логарифмической фазе роста¹, хлорангидрид акриловой кислоты (**ХАК**), полученный по методике [4]; ¹⁴C-меченный хлорангидрид уксусной кислоты (**ХУК**) с удельной активностью 81,4 МБк/мл (2,2 мКи/мл) и ¹²⁵I-меченный иодид натрия с удельной активностью 2,8 ГБк/г (75 мКи/мл). Радиоактивность измеряли на приборе «Mark-3» фирмы «Tracor Analytic» (США). Люминесценцию КМЛБ измеряли на люминометре, собранном из отечественных блоков на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ, состоящем из термостатируемого кюветного отделения, фотоэлектронного умножителя и детектора, откалиброванного в области длин волн 490–495 нм.

Ацилирование КМЛБ метченным ацетилхлоридом проводили в фосфатном буферном растворе 0,05 м (рН 7,8), содержащем 0,3 м. NaCl, на холода при постоянном перемешивании, прибавляя хлорангидрид порциями по 25 мкл через 30 мин. От свободной метки КМЛБ отмывали многократной промывкой 0,05 м. ацетатным буферным раствором, содержащим 0,3 м. NaCl (рН 6,0), с последующим центрифугированием и контролем радиоактивности промывных вод (до выхода ее на фоновый уровень).

Аналогично проводили и ацилирование предварительно разрушенных клеток. В этом случае мембранные фракции, выделенные центрифугированием при 7000 об/мин в течение 10 мин, отмывали от свободной метки многократной промывкой тем же ацетатным буферным раствором, а бесклеточный экстракт очищали диализом.

Разрушение КМЛБ проводили осмотическим шоком с дополнительным замораживанием — оттаиванием биомассы по методике [5] (100%-ное разрушение клеток), а также ультразвуком частотой 35 кГц с интегральным временем 3 мин.

¹ Образцы клеток были любезно предоставлены сотрудниками кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Иодирование клеток осуществляли по несколько измененной методике [6]. В коническую колбу на 20 мл при перемешивании магнитной мешалкой последовательно вносили 2 мл суспензии КМЛБ с концентрацией $8,3 \cdot 10^8$ клеток/мл в 0,05 м. Na-фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 0,3 м. NaCl; 25 мкл Na ^{125}I с активностью 2,8 ГБк/мл (75 мКи/мл); 25 мкл Na-фосфатного буфера 0,25 м., содержащего 0,3 м. NaCl (рН 7,5); 25 мкл свежеприготовленного раствора хлорамина Т, с концентрацией 10 мг/мл в 0,05 м. Na-фосфатном буфере. Через 1 мин добавляли 100 мкл раствора тиосульфата Na с концентрацией 2 мг/мл в 0,05 м. Na-фосфатном буфере (4 раза по 25 мкл). Затем добавляли 75 мкл раствора неактивного KI для конкурентного вытеснения иода из мест его неспецифической сорбции. От свободной метки КМЛБ отмывали десятикратным центрифугированием при 7000 об/мин с промывкой 0,05 м. Na-фосфатным буферным раствором, содержащим 0,3 м. NaCl (рН 7,8) и оставляли на холода на ночь. Затем делали еще несколько промывок тем же буферным раствором до фонового уровня радиоактивности в промывных водах.

Для введения в состав клетки ненасыщенных двойных связей была использована хорошо изученная нами ранее реакция ацилирования аминогрупп ФАВ хлорангидридом акриловой кислоты. В качестве модельных клеток были выбраны КМЛБ. Выбор обусловлен тем обстоятельством, что такие клетки содержат внутриклеточный фермент – люциферазу, чрезвычайно чувствительный к действию различных, в том числе и ацилирующих, агентов [7]. Последнее позволяет по тушению люминесценции этого фермента легко контролировать проникновение ХАК через мембрану клетки, если оно происходит.

При ацилировании суспензии интактных КМЛБ различными ацилирующими агентами было обнаружено, что использование как насыщенных (ацетилхлорид), так и ненасыщенных (ХАК) хлорангидридов карбоновых кислот приводит к резкому падению свечения клеток (рис. 1). Этот факт свидетельствует о том, что при взаимодействии с клеткой молекул ацилирующего агента происходит инактивация отвечающего за свечение фермента – люциферазы, который может локализоваться как в мембранным, так и во внутриклеточном пространстве [8].

В работах [9, 10] показано, что при ацилировании водных растворов высокомолекулярных ФАВ (белков и аминосодержащих полисахаридов) хлорангидридами кислот в нейтральных и слабощелочных средах в первую очередь в реакцию вступают аминогруппы этих веществ. В исследуемых клетках весовое соотношение между белками, содержащимися в мембране клетки и внутриклеточном материале, определенное измерением концентрации белка по методу Лоури [11], составляет 1:4–1:5. Это позволяет предположить, что при взаимодействии хлорангидридов кислот с водной суспензией клеток, если они проникают внутрь клеток, ацилированию должны подвергаться главным образом внутриклеточные компоненты, а это может сделать невозможным процесс их дальнейшей полимеризации.

Для изучения распределения продуктов ацилирования в клетках, суспензию интактных клеток подвергали ацилированию меченным ^{14}C -ацетилхлоридом при рН 7,8 с последующим разрушением ацилированных клеток осмотическим шоком или ультразвуком и измерением радиоактивности мембранный и внутриклеточной фракций (таблица). Из таблицы видно, что независимо от степени ацилирования клеток и способа их разрушения, распределение радиоактивности в мембранный фракции и внутриклеточном экстракте практически постоянно, причем максимум радиоактивности приходится на мембранный фракцию (несмотря на пониженное содержание в ней белкового компонента), и лишь часть радиоактивности оказывается во внутриклеточном материале.

Наблюдаемый эффект может быть обусловлен двумя обстоятельствами. Первое – кроме белков мембрана клетки содержит другие легко ацилируемые компоненты, тем более, что изученные клетки относятся к группе грамотрицательных бактерий с повышенной концентрацией в мембране аминосодержащих полисахаридов [12]. Вторым обстоятельством могут

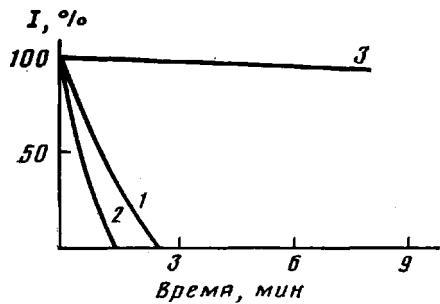


Рис. 1

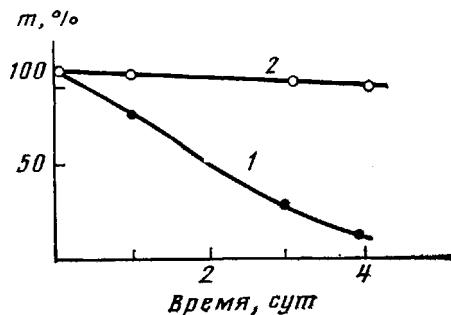


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость интенсивности свечения КМЛБ от времени при их ацилировании. 1 – ХАК (0,2%), 2 – ХУК (0,2%), 3 – контроль (интактные клетки)

Рис. 2. Зависимость радиоактивности полиакриламидного геля от времени его промывания в питательной среде. Гели получены сополимеризацией $8,3 \cdot 10^8$ клеток, ацилированных ХУК (1) или ХАК (2), со 100 мг А и 10 мг БИС в 1 мл фосфатного буферного раствора 0,05 м., содержащего 0,3 м. NaCl

являться диффузионные ограничения для проникновения молекул ацилирующего агента через мембрану клетки.

С целью выяснения причины повышенной способности мембранных компонентов клеток участвовать в реакции ацилирования был изучен процесс ацилирования предварительно разрушенных клеток. Для этого клетки разрушали одним из названных выше способов, затем продукты разрушения ацилировали ^{14}C -ацетилхлоридом, мембранные и внутриклеточную фракции разделяли и измеряли радиоактивность в каждой фракции.

Из таблицы видно, что при таком способе ацилирования максимум радиоактивности приходится уже на внутриклеточный экстракт, хотя соотношение радиоактивности во внутриклеточной и мембранных фракциях (2,3–3,9) несколько отличается от соотношения белковых компонентов в тех же фракциях (4–5), вероятно из-за вклада в реакцию аминосодержащих полисахаридов мембранных. Отсюда можно заключить, что при ацилировании интактных клеток наиболее эффективно реагируют аминосодержащие компоненты мембранных, а сама мембрана препятствует проникновению ацилирующего компонента внутрь клетки. Следовательно, в данном случае можно надеяться на реализацию идеи создания «супермакромономеров» путем ацилирования интактных клеток без заметного изменения жизненно важных функций этих клеток.

Для ответа на вопрос о способности модифицированных клеток участвовать в реакциях полимеризации был использован также метод радиоактивных индикаторов. Клетки предварительно метили ^{125}I , а затем ацилировали ХАК и ХУК и вводили в реакцию сополимеризации с акриламидом

Результаты ацилирования КМЛБ меченным ^{14}C -ацетилхлоридом

Тип клеток	Количество хлорангидридных групп на 1 клетку	Радиоактивность, %		Способ разрушения клеток
		в мембранный фракции	в бесклеточном экстракте	
Целые клетки	$9,49 \cdot 10^3$	72,7	27,3	Ультразвук
	$1,88 \cdot 10^4$	62,8	37,2	Ультразвук
	$1,89 \cdot 10^5$	81,8	18,2	Оsmотический шок
	$2,03 \cdot 10^5$	71,4	28,6	Ультразвук
	$7,60 \cdot 10^5$	77,9	22,1	Оsmотический шок
	$2,35 \cdot 10^6$	63,5	36,5	Ультразвук
Предварительно разрушенные клетки	$3,67 \cdot 10^5$	20,3	79,7	Оsmотический шок
	$1,03 \cdot 10^6$	31,0	69,0	Ультразвук
	$5,11 \cdot 10^6$	30,0	70,0	Оsmотический шок

(А) и N, N'-метилен-бис-акриламидом (БИС). На рис. 2 приведена зависимость радиоактивности получаемых в результате сополимеризации гидрогелей от времени их промывания в жидкой питательной среде. Видно, что клетки, модифицированные ацетилхлоридом, физически иммобилизуются в объеме полимерного гидрогеля и могут достаточно быстро вымываться из него (рис. 2, кривая 1). Ненасыщенные же производные клеток становятся частью синтетических полимерных цепей, о чем свидетельствует низкая скорость их вымывания из гидрогеля (рис. 2, кривая 2).

Наиболее примечательным оказывается тот факт, что химически иммобилизованные клетки (несмотря на отсутствие свечения) не теряют способности к размножению. При внесении в жидкую питательную среду гидрогеля с иммобилизованными клетками биомасса возрастает в 10⁴—10⁵ раз по сравнению с исходным количеством клеток за 2 сут. При этом образующиеся клетки также не обладают способностью к свечению, а представляют собой так называемый «темновой» вариант, известный для КМЛБ [13].

Таким образом, метод радиоактивных индикаторов оказывается информативным при изучении процесса синтеза и последующих превращений весьма своеобразных и чрезвычайно перспективных для модификации свойств полимерных материалов «супермакромономеров» на основе жизнеспособных клеточных образований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Платэ Н. А., Валуев Л. И., Чупов В. В. // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 10. С. 2019.
2. Валуев Л. И., Чупов В. В., Платэ Н. А. // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1985. Т. 26. № 4. С. 404.
3. Егоров Н. С., Данилов В. С., Малков Ю. А., Исаилов А. Д. // Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. № 1. С. 68.
4. Stempel G. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1950. V. 72. № 13. P. 2299.
5. Hastings J. W., Baldwin T. O., Nicoli M. Z. // Methods in Enzymology. N. Y. 1978. P. 135.
6. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М., 1983. С. 236.
7. Баранова Н. А., Аркадьевна З. А., Егоров Н. С. // Докл. Вышш. шк. биол. наук. 1982. № 2. С. 86.
8. Гительзон Н. А., Родичева Э. К., Медведева С. Е. Светящиеся бактерии. Новосибирск, 1984. С. 82.
9. Платэ Н. А., Вакула А. В., Валуев Л. И., Лыс Я. И., Федосеев В. М. // Прикл. биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. № 1. С. 81.
10. Платэ Н. А., Валуев Л. И., Гумирова Ф. Х., Лыс Я. И., Федосеев В. М. // Высокомолек. соед. Б. 1982. Т. 24. № 6. С. 470.
11. Folin G., Chiocteau V. // J. Biol. Chem. 1927. № 3. P. 627.
12. Тысячная И. В., Фечина В. А., Яковлева В. И., Березин И. В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1984. Т. 20. № 4. С. 435.
13. Баранова Н. А., Данилов В. С., Егоров Н. С. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 252. № 4. С. 1009.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

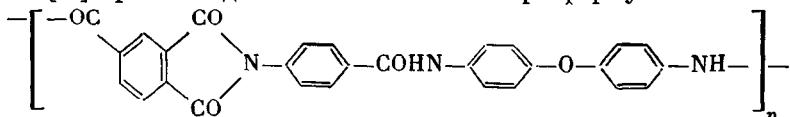
Поступила в редакцию
19.V.1987

УДК 541.64:539.2

РЕЛАКСАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ В ПОЛИАМИДОИМИДАХ

Хоменкова К. К., Замулина Л. И., Роговицкий В. Ф.,
Бабкина Н. В.

Ранее [1] при исследовании пленок полимера формулы



показано, что полиамидоимиды (ПАИ) существенно отличаются по своим термомеханическим свойствам от аморфных и кристаллизующихся гибко-