

Э. С. Содиков, К. С. Казаков

НЕКОТОРЫЕ НОВЫЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ИЗОНИАЗИДА НА АКТИВНОСТЬ ТРАНСАМИНАЗ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Узбекский научно-исследовательский институт туберкулеза, Ташкент

Медь и кобальт, структурируясь в изониазиде, повышают его угнетающее действие на аланин-аминотрансферазу (АЛ-Т), а соединяясь с пиридоксин, уменьшают активность АЛ-Т и, наоборот, усиливают активность аспартат-аминотрансферазы.

По данным литературы, механизм угнетения изониазидом пиридоксин-зависимых ферментов обусловлен двумя факторами: наличием конкуренции между изониазидом и пиридоксаль-5-фосфатом как структурных аналогов за место в активном центре ферментов [1]; химическим взаимодействием между изониазидом и витамином В₆ с образованием гидразона, лишенного витаминных свойств и угнетающего пиридоксалькиназу — фермент, фосфорилирующий пиридоксин [2—4]. В то же время известно, что изониазид активно связывает не только пиридоксин, но и микроэлементы [5—8], причем в комплексе с медью он значительно сильнее угнетает активность некоторых ферментов (например, каталазы) [9, 10].

В связи с изложенным необходимо было установить, происходит ли возникновение комплексного соединения микроэлементов с изониазидом, в частности изониазида с медью, в организме при длительной химиотерапии, а также исследовать, каким образом это влияет на обмен витамина В₆ и активность трансаминаз.

На основании полученных результатов мы попытались наметить пути устранения угнетающего действия изониазида на активность трансаминаз при лечении туберкулеза.

Методика

Было проведено 4 опыта на 180 кроликах массой 1,5—2 кг, зараженных туберкулезной культурой Bovinus 8, вводимой в дозе 0,0001 мг внутривенно. Первый опыт был поставлен на 45 кроликах; 40 животных были заражены, 5 здоровых были контрольными. Через 2 мес после заражения было забито 5 кроликов; в органах установлена генерализация туберкулезного процесса. После этого 20 животных лечили изониазидом в дозе 15 мг/кг в течение 9 мес, а оставшиеся 15 животных препаратов не получали. Кроликов декапитировали через 1, 3, 6 и 9 мес лечения (по 5 в группе). Второй опыт был проведен на 35 кроликах; 30 животных были заражены, 5 были контрольными. Инфицированных животных разделили на 4 группы. Животные 1-й группы получали 15 мг/кг изониазида, 2-й — 15 мг/кг изониазида и 0,05 мг/кг соединения изониазида с медью, 3-й — 15 мг/кг изониазида и 0,1 мг/кг соединения изониазида с кобальтом *, животные 4-й группы препаратов не получали и служили инфицированным контролем. Лечение изониазидом начинали через 2 мес после заражения и продолжали в течение 3¹/₂ мес. Микроэлементы давали с 15-го дня лечения изониазидом в течение 2¹/₂ мес. Третий опыт был проведен на 59 кроликах; 53 кролика были заражены туберкулезом, 6 здоровых были контрольными. Инфицированных животных разделили на 4 группы: кролики 1-й группы получали изониазид, 2-й — изониазид и соединения меди с пиридоксин, 3-й — изониазид и соединения кобальта с пиридоксин, кролики 4-й группы препаратов не получили и служили инфицированным контролем. Четвертый опыт проведен на 41 кролике; 36 из них были заражены туберкулезом, 5 кроликов были контрольными. В этом опыте кролики,

* Комплексные соединения синтезированы в Ташкентском фармацевтическом институте под руководством проф. М. А. Азизова [11].

как и в третьем опыте, наряду с изониазидом получали соединения меди с тиаминном и кобальт с тиаминном. Лечение животных изониазидом в третьем и четвертом опытах начинали с 40—45-го дня после заражения и продолжали в течение 80—95 дней. В этих опытах микроэлементы вводили на фоне химиотерапии двумя курсами длительностью по 15 дней с перерывом 30 дней. Препараты вводили в следующих дозах: изониазид — 15 мг/кг, пиридоксин и тиамин с медью и кобальтом в первом курсе — 0,05 мг/кг, во втором — 0,1 мг/кг.

Содержание витамина B_6 определяли по методу Одинцовой [12], меди в сыворотке крови — по методу Макфарлана [13], в печени — по методу Бабенко [14], ферменты аланин-аминотрансферазу (АЛ-Т) и аспартат-аминотрансферазу (АС-Т) в сыворотке крови — по методу Пасхиной [15], в печени — по методу Мешковой и Северина [16]. В последнем случае контроль проводили методом хроматографии на бумаге. Активность выражали в микромолях образующейся за 4 ч инкубации аминокислоты на 1 г взятой ткани.

Результаты и обсуждение

В первом опыте, где длительность лечения изониазидом составила 9 мес., нами выявлена периодичность усиления тормозящего действия изониазида на активность АЛ-Т, что совпадало с повышением содержания меди в сыворотке крови (табл. 1).

Угнетающее действие изониазида особенно выражено на первом (1 мес) и последнем (9 мес) этапах лечения, когда происходило повышение содержания меди в крови соответственно до $220 \pm 33,7$ и $166 \pm 17,8$ мкг% при норме $90,9 \pm 9,3$ мкг%. В начале увеличение содержания меди, вероятно, было связано с туберкулезной инфекцией, а в последствии, по-видимому, с нарушением утилизации ее под влиянием длительного лечения изониазидом.

Итак, повышение содержания меди в крови при туберкулезной инфекции, рассматриваемое как защитная реакция, с момента введения изониазида обретает иной характер, т. е. усиливает его угнетающее действие. Механизм этого явления мы связываем с образованием в организме соединений изониазида с медью. Для доказательства этого положения мы провели второй опыт. Полученные результаты (табл. 2) показывают, что введение зараженным туберкулезом животным синтетических соединений изониазида с медью или кобальтом, как и в первом опыте, приводит к понижению почти в 2—3 раза активности АЛ-Т в печени.

Т а б л и ц а 1

Содержание меди в сыворотке крови и активность АЛ-Т в печени при длительном лечении экспериментального туберкулеза изониазидом ($M \pm m$)

Группа животных	Срок лечения, мес	Содержание меди в крови, мкг%	Активность АЛ-Т в печени, мкмоль/г
Контроль	—	$90 \pm 9,3$	$185 \pm 6,7$
Зараженные туберкулезом	—	$220 \pm 33,7$ $<0,01$	$244 \pm 8,9$ $<0,01$
Зараженные туберкулезом и леченные изониазидом	1	—	$91 \pm 5,7$ $<0,001$
То же	3	$60 \pm 4,1$ $<0,01$	$325 \pm 20,7$ $<0,001$
То же	6	$120 \pm 12,2$ $>0,5$	$186 \pm 19,4$ $>0,5$
То же	9	$166 \pm 17,8$ $<0,01$	$133 \pm 3,5$ $<0,001$

При этом установлена следующая закономерность: независимо от того, вводим ли комплекс изониазида с медью или же в сыворотке крови происходило повышение концентрации меди, отмечалось лишь снижение активности АЛ-Т.

В третьем опыте показано, что комплексные соединения пиридоксина (так же, как и изониазида) с медью или кобальтом снижают активность АЛ-Т примерно в $1\frac{1}{2}$ раза (табл. 3).

Т а б л и ц а 2

Активность АЛ-Т и АС-Т (в мкмоль/г) в печени при введении комплекса изониазида с медью и кобальтом

Группа животных	Статистический показатель	Активность	
		АЛ-Т	АС-Т
Введение изониазида	$M \pm m$	131,6 3,0	179 17,1
	P_1	$<0,001$	$<0,001$
Введение изониазида и комплекса изониазида с медью	$M \pm m$	68,3 8,3	229 38
	P_1	$<0,001$	$>0,1$
	P_2	$<0,001$	$>0,2$
Введение изониазида и комплекса изониазида с кобальтом	$M \pm m$	35,7 1,5	211 35,8
	P_1	$<0,001$	$\leq 0,05$
	P_2	$<0,001$	$\geq 0,5$
Контроль	$M \pm m$	157 4,8	303 19,9

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4 P_1 дано по сравнению с контролем, P_2 — по сравнению с животными, получавшими один изониазид.

Т а б л и ц а 3

Содержание меди, пиридоксина и активность (в мкмоль/г) ААЛ-Т и АС-Т при введении комплекса пиридоксина с медью и кобальтом

Группа животных	Статистический показатель	Содержание меди, мкг%		Содержание пиридоксина, мкг/г	Активность	
		в сыворотке крови	в печени	в печени	АЛ-Т	АС-Т
Введение изониазида	$M \pm m$	70 8,3	328 21,9	5,0 0,6	125 22	176 16
	P_1	$>0,1$	$<0,01$	$<0,02$	$>0,5$	$<0,001$
Введение изониазида и комплекса пиридоксина с медью	$M \pm m$	187 12	323 30,7	6,6 0,4	86,0 4,2	262 23
	P_1	$<0,001$	$<0,05$	$>0,5$	$<0,001$	$<0,02$
	P_2	$<0,001$	$>0,5$	$<0,05$	$>0,1$	$<0,02$
Введение изониазида и комплекса пиридоксина с кобальтом	$M \pm m$	70 9,3	366 48,8	7,9 0,7	69,6 5,7	259 17,4
	P_1	$>0,05$	$>0,2$	$>0,5$	$<0,001$	$<0,01$
	P_2	0	$>0,5$	$<0,05$	$<0,002$	$<0,01$
Контроль	$M \pm m$	100 11,1	430 21	7,2 0,3	130 5,1	363 18,4

Однако комплекс пиридоксина с медью или кобальтом в отличие от комплекса изониазида с медью или кобальтом оказывает положительное влияние на содержание пиридоксина и активность АС-Т, увеличивая ее в $1\frac{1}{2}$ раза (см. табл. 3).

Следовательно, медь и кобальт, структурируясь с изониазидом, угнетают активность АЛ-Т и почти не влияют на активность АС-Т; соединяясь с пиридоксином, они также уменьшают активность АЛ-Т и, наоборот, повышают активность АС-Т.

Необходимо отметить, что увеличение содержания меди в сыворотке крови до применения изониазида не оказывает отрицательного влияния на активность трансаминаз (см. табл. 1). Медь и кобальт могут влиять на активность трансаминаз не в свободном виде, а в соединении с пиридоксином или его структурным аналогом (изониазидом). Для уточнения этого положения в следующем опыте использовали те же микроэлементы, но в соеди-

Т а б л и ц а 4

Содержание меди и активность АЛ-Т и АС-Т (в мкмоль/г) при введении комплекса меди и кобальта с тиамином

Группа животных	Статистический показатель	Содержание меди, мкг%		Активность	
		в сыворотке крови	в печени	АЛ-Т	АС-Т
Введение изониазида	$M \pm m$	53 7,5	275 97,2	56 14,4	194 15,6
	P_1	<0,02	<0,05	<0,01	<0,001
Введение изониазида и комплекса меди с тиамином	$M \pm m$	95 27,4	371 72,9	78 23,7	202 9,6
	P_1	—	>0,5	<0,01	>0,05
	P_2	<0,02	>0,5	>0,5	>0,5
Введение изониазида и комплекса кобальта с тиамином	$M \pm m$	91 10,8	400 41	108 18,3	226 45,3
	P_1	>0,5	>0,5	<0,05	<0,05
	P_2	<0,05	<0,05	<0,05	>0,5
Контроль	$M \pm m$	95 10,2	436 56	180 16,4	345 9,6

нении с тиамином, который не является структурным аналогом пиридоксина. Установлено, что хотя комплекс меди или кобальта с тиамином способствует накоплению меди в крови и печени в большей степени, чем комплекс меди и кобальта с изониазидом и пиридоксином, но он не снижает активность АЛ-Т, напротив, наблюдается повышение ее в $1\frac{1}{2}$ —2 раза (табл. 4). Приведенные данные показывают, что механизм снижения активности АЛ-Т и АС-Т при длительном лечении туберкулеза изониазидом различен, а включение пиридоксина в биологические реакции в определенной степени зависит от взаимодействия микроэлементов с изониазидом и самим пиридоксином в организме.

Таким образом, получены новые данные об угнетающем действии изониазида на активность трансаминаз при длительном его применении и найдены препараты, оказывающие положительное влияние на активность АС-Т и содержание пиридоксина (комплекс пиридоксина с медью и кобальтом), на активность АЛ-Т и обмен меди (комплекс тиамин с медью и кобальтом). Достигнуть аналогичного результата путем применения простых солей микроэлементов или обычных витаминов не удавалось из-за парадоксального положения, создающегося в организме при длительном лечении туберкулеза изониазидом [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Lichstein H. G. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. G.)», 1955, v. 88, p. 519—522.
2. Biehl J. P., Vilter R. W. — «J. A. M. A.», 1954, v. 156, p. 1549—1552.
3. Б у к и н Ю. В. — В кн.: Современное состояние теоретических проблем фтизиатрии.

М., 1968, с. 57—60. — 4. Он же. — В кн.: Химия и биология пиридоксалевого катализа. М., 1968, с. 437—444. — 5. Горкин В. З., Кривченкова Р. С. — «Вопр. мед. химии», 1964, № 2, с. 149—154. — 6. Preziosi P., Porcellati G. — «Boll. Soc. ital. Biol. sper.», 1953, v. 29, p. 1909—1911. — 7. Albert A. — «Nature», 1956, v. 177, p. 525—526. — 8. Сумерман-Краиг I., Willis D. et al. — —ibid., v. 176, p. 34—35. — 9. Maher I. R., Speyer G., Levine M. — «Am. Rev. Tuberc.», 1957, v. 75, p. 517—518. — 10. Rothmann F. G., Stutgen C. Z. Цит. Сидорова В. В. — «Совр. пробл. туб.», 1959, № 3, с. 13—14. — 11. Азизов М. А. О комплексных соединениях некоторых микроэлементов с биоактивными веществами. Ташкент, 1969. — 12. Одинцова Е. Н. Микробиологические методы определения витаминов. М., 1959. — 13. Макфарлан Цит. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., 1953. — 14. Бабенко Г. О. Визначення мікроелементів і металоферментів у клінічних лабораторіях. Київ, 1968. — 15. Пасхина Т. С. Определение глютаминаспарагиновой и глютаминоаланиновой аминотераз (трансаминаз) в сыворотке крови человека. М., 1959. — 16. Мешкова Н. П., Северин С. Е. Практикум по биохимии животных. М., 1950. — 17. Содиков Э. С., Гапонько Л. А. — «Пробл. туб.», 1971, № 8, с. 74—78.

Поступила 14/1 1977 г.

SOME NEW ASPECTS OF ISONIAZID EFFECT ON TRANSAMINASES ACTIVITY IN TUBERCULOSIS

E. S. Sobikov, K. S. Kazakov

Uzbek Research Institute of Tuberculosis, Tashkent

New evidence is obtained for inhibitory effect of isoniazid on activity of transaminases in prolonged application of the drug. Increase in the isoniazid inhibitory effect on alanine aminotransferase activity was shown to correlate with elevated concentration of Cu^{2+} in blood serum arising in experimental tuberculosis. Cu^{2+} and Co^{2+} caused the increase in the inhibitory effect of isoniazid due to their incorporation into structure of the preparation. These microelements, combined with pyridoxine, inhibited alanine aminotransferase and vice versa activated aspartate aminotransferase.

УДК 616.12-007.61-008.931:577.152.32

Н. П. Ларионов

О СОСТОЯНИИ ГЛИКОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ГИПЕРТРОФИРОВАННОМ СЕРДЦЕ

Лаборатория патофизиологии сердца Института общей патологии и патофизиологии АМН СССР, Москва, кафедра химии Красноярского медицинского института

В гипертрофированном сердце крысы через 2 мес после создания коарктации аорты резко увеличивается обновление гликогена, о чем свидетельствует ускорение в $4\frac{1}{2}$ раза включения меченой ^{14}C -глюкозы в гликоген и выведения метки из гликогена при перфузии сердца в препарате Лангендорфа. Стационарно активируется гликолиз, вследствие чего из изолированного гипертрофированного сердца в аэробных условиях выделяется в 2 раза больше лактата, чем из интактного. Активность гликолитических ферментов, экстрагируемых из интактной и гипертрофированной сердечной мышцы в оптимальных условиях инкубации существенным образом не отличается, что дает возможность сделать вывод о значительной потенциальной активности гликолитической системы в миокарде в условиях *in vivo*, которая активируется в гипертрофированной сердечной мышце.

Общим механизмом долговременной адаптации сердца к увеличенной нагрузке является гипертрофия миокарда, развивающаяся вследствие активации генетического аппарата и ускорения синтеза нуклеиновых кислот и белка, которая вызывает постепенное снижение сократительной функции в расчете на единицу веса. В конечном счете сократительная функция миокарда может нормализоваться в полной мере, однако энергетика сердца в процессе развития гипертрофии приобретает ряд новых черт, одна из которых — стационарная активация гликолиза [1, 2]. Об этом свидетельствуют установленные нами факты увеличения степени включения ^{14}C -глюкозы

в гликоген гипертрофированного сердца и активации образования лактата [2, 3].

В настоящей работе приводилось дальнейшее изучение состояния гликолитической системы гипертрофированного сердца. Было рассмотрено три вопроса: в какой мере выведение метки из гликогенных депо соответствует многократному ускорению включения ^{14}C -глюкозы в гликоген в процессе развития гипертрофии сердца; увеличивается ли мощность гликолитического механизма в гипертрофированном сердце или активация гликолиза обеспечивается за счет использования потенциальных возможностей вследствие активации лимитирующего звена; какую роль играют нарушения в системе окислительного фосфорилирования в процессе стационарной активации гликолиза гипертрофированного сердца.

Методика

В работе были использованы белые крысы-самцы массой 150—180 г, которым в 3—4 раза суживали просвет аорты в брюшном отделе [4]. В опыт брали животных без признаков сердечной недостаточности спустя 2 мес после операции. Масса крыс к этому времени достигала 250—280 г, а относительный вес сердца увеличивался на 40—50%.

Для определения скорости обновления гликогена в миокарде животным вводили по 12 мкКи равномерно меченной ^{14}C -глюкозы внутрибрюшинно за 30 мин до декапитации, после которой сердца крыс отмывали в холодном физиологическом растворе с гепарином и часть их замораживали в жидком азоте. Концентрацию гликогена и его удельную активность в этой группе принимали за исходную. Другую часть сердец перфузировали по Лангендорфу растворами Кребса — Хенделайта [5] в течение 30 мин под давлением 60 мм рт. ст. в условиях искусственно навязанного электростимуляции ритма сокращений, равного 200 в минуту. Перфузионный раствор газировали смесью, содержащей 95% кислорода и 5% CO_2 , температура 30°C . Скорость выведения метки из гликогена рассчитывали на основании его удельной активности до и после перфузии. Концентрацию гликогена определяли по методу [8], радиоактивность рассчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика на установке «MARK II». Мощность гликолитического механизма в интактном и гипертрофированном сердце оценивали по величине выделения лактата изолированным, перфузируемым по Лангендорфу сердцем в анаэробических условиях. Для этой цели раствор Кребса газировали смесью 95% азота и 5% CO_2 . За состоянием сократительной функции и выделением лактата наблюдали в течение 5-минутного периода аноксии и последующих 10 мин реаксигенации. В этом опыте в полость левого желудочка помещали латексный баллончик, который наполняли таким образом, чтобы механизм Франка — Старлинга был мобилизован в полной мере. В полости левого желудочка с помощью электроманометра «Баровар» регистрировали величину систолического давления. Скорость потребления кислорода гипертрофированным сердцем и выделение им лактата в условиях стандартной нагрузки сопоставлены на третьем этапе эксперимента, где были использованы препараты изолированного работающего сердца [5]. Метод опи-

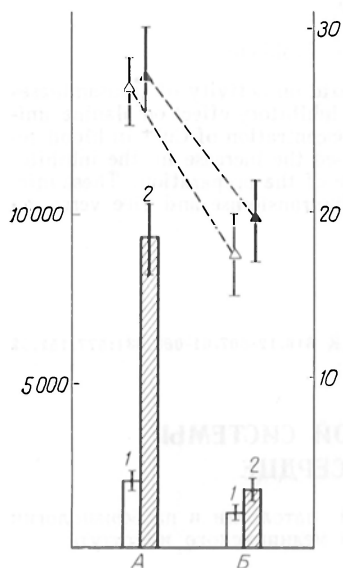


Рис. 1. Концентрация (треугольники) и удельная активность (столбики) гликогена в интактном (1) и гипертрофированном (2) сердце до перфузии и через 30 мин перфузии в препарате Лангендорфа.

По оси ординат слева — число импульсов в минуту на 1 мг гликогена. Справа — концентрация гликогена (в мкмоль/г). А — до перфузии; Б — после перфузии.

сан нами ранее [3]. Давление наполнения равнялось 10 см вод. ст., сердца сокращались спонтанно. Кислород в перфузатах определяли полярографически, используя закрытый электрод Кларка, лактат — ферментным методом [7]. Состояние гликолитической системы дополнительно оценивали с помощью определения активности гликолитических ферментов в экстрактах из сердечной мышцы. Активность гексокиназы, фосфофруктокиназы, альдолазы и лактатдегидрогеназы определяли с помощью ферментных методов [8, 9]. Для экстракции использовали 0,1 н. фосфатный буфер pH 7,2, среда выделения содержала 0,05 М трис-буфера, 0,001 М ЭДТА и 0,002 М меркаптоэтанол. Для выделения ФФК pH среды выделения увеличивали до 8,2 и добавляли 0,005 М MgCl_2 . Блок определяли по методу Лоурри.

Результаты и обсуждение

Материалы, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что включение ^{14}C -глюкозы в гликоген гипертрофированного сердца увеличено по сравнению с интактным в $4\frac{1}{2}$ раза, в то время как концентрация гликогена не изменена. 30-минутная перфузия сердец в препарате Лангендорфа сопровождается резким уменьшением удельной активности гликогена в контроле и гипертрофированном сердце. Концентрация гликогена в контроле и опыте за время перфузии уменьшилась на 20—25%.

Зная исходную и конечную величину концентрации и удельной активности гликогена, можно ориентировочно оценить скорость выделения метки из гликогенных депо. Оказывается, что из гипертрофированного сердца метка выводится в 4—5 раз быстрее, чем из контрольного, т. е. использование гликогена и его ресинтез увеличены в гипертрофированном сердце одинаково. Интенсификация использования гликогенных резервов наблюдается, несмотря на одинаковую нагрузку в контрольных и опытных препаратах и на одинаковую частоту сокращений.

Одной из возможных причин этой интенсификации гликогенолиза могло быть адаптивное увеличение мощности гликолитической системы в процессе развития гипертрофии. С целью проверки этого предположения был выполнен специальный эксперимент, в ходе которого мощность гликолитической системы оценивали по величине выделения лактата изолированными интактными и гипертрофированными сердцами в аэробных и анаэробических условиях. Результаты представлены на рис. 2, из которого видно, что в условиях максимальной стимуляции механизма Франка — Старлинга в аэробных условиях гипертрофированное сердце выделяет на 80% больше лактата, чем интактное. Известно, что образование лактата в сердечной мышце хорошо коррелирует с величиной ее сократительной функции [10], однако основной показатель интенсивности функции сердца (ИФС) — произведение величины систолического давления на частоту сокращений — в гипертрофированном сердце не только не увеличен, но даже снижен на 70%. Таким образом, оказывается, что в аэробных условиях на единицу сократительной функции гипертрофированное сердце выделяет в 2 раза больше лактата, чем интактное. Этот результат, по-видимому, свидетельствует о сниженной мощности аэробного ресинтеза АТФ в митохондриях, что соответственно компенсируется активацией гликолиза.

В анаэробических условиях выделение лактата из гипертрофированного сердца удваивается, в то же время из интактного сердца выделение лактата

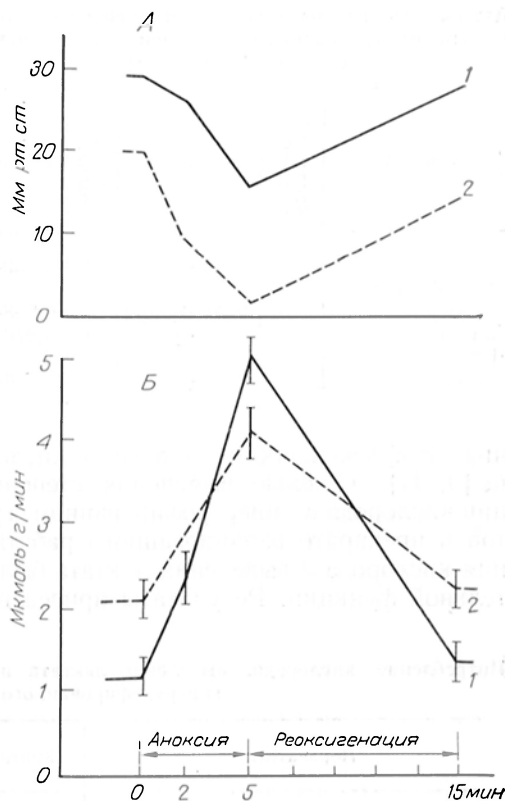


Рис. 2. Изменение систолического давления в левом желудочке (А) и выделение лактата (Б) в изолированном интактном (1) и гипертрофированном (2) сердце в течение 5 мин анаэробии и последующей реоксигенации.

возрастает в $4\frac{1}{2}$ раза, вследствие чего на 5 мин от начала аноксии в контроле выделяется лактата на 20% больше, чем в опыте. Таким образом, стационарную активацию гликолиза, наблюдаемую в гипертрофированном сердце в аэробных условиях, нельзя объяснить увеличением мощности гликолитической системы. Об этом же говорят и результаты определения активности индивидуальных гликолитических ферментов, которые представлены в табл. 1.

В ходе этих определений было найдено, что активность гексокиназы, фосфофруктокиназы, альдолазы и лактатдегидрогеназы в гипертрофиро-

Т а б л и ц а 1
Активность гликолитических ферментов в интактной и гипертрофированной сердечной мышце, мкмоль/мг белка в 1 мин ($M \pm m$)

Фермент	Число наблюдений	Контроль	Число наблюдений	Гипертрофия
Гексокиназа	10	$0,042 \pm 0,005$	9	$0,050 \pm 0,008$
Фосфофруктокиназа	10	$0,204 \pm 0,011$	9	$0,238 \pm 0,014$
Альдолаза	10	$0,510 \pm 0,050$	9	$0,470 \pm 0,045$
Лактатдегидрогеназа	12	$7,3 \pm 0,5$	9	$7,6 \pm 0,6$

ванном сердце не меняется существенным образом, поэтому факт стационарной активации гликолиза и интенсификации обновления гликогенных резервов можно объяснить использованием потенциальных возможностей ферментов, которые активируются в условиях *in vivo*.

Одним из возможных механизмов такой активации может быть нарушение в системе окислительного фосфорилирования, о чем свидетельствует установленный недавно факт

низкой эффективности утилизации кислорода в гипертрофированном сердце [3, 11]. С целью выяснения степени падения эффективности утилизации кислорода в гипертрофированном сердце на третьем этапе экспериментов в препарате изолированного работающего сердца величины потребления кислорода и выделения лактата были сопоставлены с уровнем сократительной функции. Результаты приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2
Потребление кислорода, выделение лактата и сократительная функция интактного и гипертрофированного сердца ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Гипертрофия	Различие	
			%	P
Частота сокращений в минуту	160 ± 9	150 ± 8	-6	—
Систолическое давление, мм рт. ст.	85 ± 5	100 ± 6	+16	—
ИФС мм рт. ст.				
$10^3 \times$ вес, г	64 ± 3	38 ± 3	-42	<0,001
Минутный объем, мл/г/мин	85 ± 12	65 ± 10	-23	—
Коронарный проток, мл/г/мин	32 ± 3	21 ± 2	-34	<0,01
Потребление кислорода, ммоль/ч/г	$1,19 \pm 0,13$	$1,08 \pm 0,11$	-9	—
Выделение лактата, мкмоль/мин/г	$4,4 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,5$	+9	—

Можно видеть, что потребление кислорода и выделение лактата в гипертрофированном сердце в стандартных условиях в расчете на 1 г ткани не отличаются от таковых в интактном сердце. Однако, как известно, эти показатели находятся в прямой зависимости от величины сократительной функции и в первую очередь от произведения частоты сокращений на величину систолического давления — ИФС [12], а этот показатель в гипертрофированном сердце снижен на 42%. В результате относительная величина, характеризующая выделение лактата на единицу сократительной функции, оказывается увеличенной на 82%, а потребление кислорода — на 55%. Уве-

личение потребления кислорода в расчете на величину сократительной функции в гипертрофированном сердце соответствует имеющимся в литературе данным [11] и свидетельствует о падении эффективности утилизации кислорода. Анализируя возможные механизмы этого явления, следует иметь в виду, что митохондрии, выделенные из гипертрофированной сердечной мышцы, по своим основным характеристикам не отличаются от выделенных из интактных. Причина низкой эффективности гипертрофированного сердца, по мнению Меерсона, заключается в разобщающем действии увеличенной концентрации ионов Ca^{2+} в миоплазме [13]. Нарастание концентрации Ca^{2+} в сердечной мышце по мере развития ее гипертрофии, обусловленное, по-видимому, снижением мощности Ca^{2+} -насоса, наблюдали другие авторы [14]. Об этом же свидетельствуют многочисленные физиологические эксперименты, в ходе которых показано, что в процессе развития гипертрофии и, по-видимому, вследствие увеличения концентрации Ca^{2+} в миоплазме снижается скорость и степень расслабления сердечной мышцы в диастоле [15].

Приведенные данные позволяют сделать заключение о том, что причиной стационарной активации гликолиза в гипертрофированном сердце может быть нарушение эффективности утилизации кислорода вследствие разобщающего действия увеличенной концентрации Ca^{2+} в миоплазме. Однако нельзя исключать и других возможностей, в частности того, что Ca^{2+} сам по себе может непосредственно активировать фосфоорилазу и через нее всю гликолитическую систему.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bishop S., Altshuld R. — «Am. J. Physiol.», 1970, v. 218. — 2. Меерсон Ф. З., Ларионов Н. П. — «Кардиология», 1969, № 1, с. 17. — 3. Онн же. — Там же, 1975, № 4, с. 10. — 4. Безнас М. — «Circulat. Res.», 1958, v. 6, p. 207. — 5. Neely J., Liebermeister H., Batterbay E. et al. — «Am. J. Physiol.», 1967, v. 212, p. 804. — 6. Bloom W., Lewis G. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 188, p. 631. — 7. Hochorst T. — «Biochem. Z.», 1959, Bd 332, S. 1959. — 8. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971, с. 107; 146, 157, 210. — 9. Reeves P. — «Am. J. Physiol.», 1963, v. 205, p. 23. — 10. Nelly J., Liebermeister H., Morgan H. — Ibid., p. 815. — 11. Gunning J., Coleman H. — «J. molec. Cardiol. cell.», 1973, v. 5, p. 25. — 12. Braunwald E., Ross J., Sonnenblik E. Mechanism of Contraction of the Normal and Failing Heart. Boston, 1968. — 13. Меерсон Ф. З. Адаптация сердца к большой нагрузке и сердечная недостаточность. М., 1975. — 14. Tobias L., Duke M. — «Am. J. Physiol.», 1969, v. 217, p. 522. — 15. Меерсон Ф. З., Капелько В. И., Пшенинкова М. Г. — «Вестн. АМН СССР», 1968, № 2, с. 32.

Поступила 15/1 1977 г.

ON THE STATE OF GLYCOLYTIC SYSTEM IN HYPERTROPHIC HEART

N. P. Larionov

Laboratory of Heart Pathophysiology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, Chair of Chemistry, Medical School, Krasnoyarsk

A turnover of glycogen was distinctly increased in hypertrophic rat heart within 2 months after coarctation of aorta; this was corroborated by increased 4.5-fold incorporation of ^{14}C -glucose into glycogen and by removing of label from glycogen in heart perfusion using Langendorf preparation. Due to stationary activation of glycolysis secretion of lactate from isolated hypertrophic heart was twice more than that from intact one in aerobic conditions. Activities of glycolytic enzymes, extracted from intact and hypertrophic heart muscles in optimal conditions of incubation, were approximately of the same value; this suggests the distinct potential activity of glycolytic system in myocardium in vivo. Decrease in oxygen utilization is apparently the reason of glycolytic system activation in development of heart hypertrophy.

В. В. Фролькис, В. В. Безруков, Х. К. Мурадян

СИНТЕЗ ФРАКЦИЙ РНК ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОДНОКРАТНОМ И МНОГОКРАТНОМ РАЗДРАЖЕНИИ ГИПОТАЛАМУСА

Институт геронтологии АМН СССР, Киев

При раздражении вентромедиального гипоталамуса в удельной радиоактивности (УР) РНК печени крыс, меченной с помощью ^{14}C -оротовой кислоты и фракционированной термическим фенольным методом, наблюдаются неравномерные по выраженности и направленности сдвиги. УР ядерной РНК при однократной стимуляции гипоталамуса возрастает в большей мере во фракции РНК-40°, в меньшей — во фракциях РНК-55° и РНК-63°. При многократной стимуляции после фазы активации отмечается ослабление синтеза ядерных фракций РНК. В цитоплазматической РНК (РНК-4°) значительный рост УР наблюдается как при однократной, так и при многократной стимуляции гипоталамуса. Стимулирующий эффект длительного раздражения гипоталамуса на синтез фракций РНК и активность глюкозо-6-фосфатазы и фруктозо-1,6-дифосфатазы «истощается» быстрее, чем при длительном введении гидрокортизона. Из полученных данных следует, что потенциальные возможности тканей-мишеней к длительной гормональной стимуляции значительно выше, чем способность гипоталамуса активировать синтез РНК и белка.

Гипоталамические влияния на метаболизм тканей, реализуемые через соответствующие гормональные системы, являются важным путем нервной регуляции трофики. Существенное значение при изучении этого механизма может иметь выяснение особенностей действия стимуляции гипоталамуса на процессы биосинтеза белка.

Ранее нами было показано, что однократное электрическое раздражение гипоталамической области приводит к выраженному росту индуктивного синтеза и вследствие этого к активации ряда ферментов [1, 2]. В подтверждение этого в настоящей работе представлены данные о влиянии однократного и многократного раздражения гипоталамуса на синтез фракций РНК печени.

Методика

Опыты проведены на 42 белых крысах-самцах в возрасте 8—12 мес. Животных содержали на обычном пищевом рационе вивария. За 12—18 ч до забоя подопытные крысы были лишены пищи, но продолжали получать воду. Как правило, животных забивали в 13—15 ч, через 1½, 3, 5 и 7 ч после электростимуляции гипоталамуса. Биполярные никромовые электроды вживляли в левое и правое вентромедиальные ядра гипоталамуса по координатам атласа [3] за 3—4 нед до опытов. Гипоталамус раздражали в условиях свободного поведения животного прямоугольными импульсами тока. Параметры раздражения: частота 100 имп/с, длительность импульса 1 мс, продолжительность всего периода раздражения 15 мин. Смену полярности тока осуществляли каждые 30 с. Силу раздражения тока подбирали до появления четких изменений поведения (настораживание, обнюхивание, «умывание», беспокойство). Эта величина составляла в среднем 50—120 мкА. Наряду с экспериментами, в которых осуществляли однократную стимуляцию гипоталамуса, были проведены опыты с многократным, на протяжении нескольких дней, раздражением гипоталамуса. В этих опытах однократную стимуляцию гипоталамуса (параметры и условия раздражения см. выше) проводили ежедневно в течение 6 сут. Животных умерщвляли в 1, 3 и 6-й дни через 5 ч после последнего сеанса стимуляции. В качестве контрольных животных были использованы крысы с вживленными электродами, но не подвергавшиеся электростимуляции.

Гидрокортизон (фирма «Гедеон Рихтер», Венгрия) вводили внутривентрально ежедневно в течение 15 сут в дозе 35 мг/кг. АКТГ вводили также внутривентрально в дозе 20 ед/кг. Животных забивали при введении АКТГ через 1½, 2½, 3½ и 7 ч после введения гормона. В опытах с многократным введением гидрокортизона, как и при многократном раздражении гипоталамуса, забой осуществляли через 5 ч после последнего введения гормона. Этот срок был выбран потому, что именно через 5 ч после однократного раздражения гипоталамуса или введения гормона в большинстве фракций наблюдается наиболее выраженный рост удельной радиоактивности (УР).

О скорости синтеза РНК судили по изменению УР соответствующих фракций. В качестве меченого предшественника РНК была использована оротовая кислота (УР 50,4 мКи/ммоль), которую вводили внутривентрально в дозе 0,2 мКи/кг за 30 мин до забоя. РНК фракционировали фенольным методом [4] с некоторыми модификациями [5] без этапа обработки ДНК-азой. При этом удается выделить одну фракцию цитоплазматической (РНК-4°) и 4 фракции ядерной РНК: пре-рРНК (РНК, состоящей в основном из

новосинтезированной рибосомальной РНК ядрышкового аппарата), РНК-55° (состоящей из смеси ядерных предшественников рРНК и иРНК), РНК-63° (состоящей из новосинтезированной информационной РНК, пре-иРНК) и РНК-85° (состоящей из ядерной гетерогенной РНК, гя-РНК). УР фракций РНК измеряли на газопротоочном счетчике с учетом самопоглощения проб [6].

Активность глюкозо-6-фосфатазы [7] и фруктозо-1,6-дифосфатазы [8] определяли в цельных гомогенатах печени, приготовленных на холоду в стеклянном гомогенизаторе.

Результаты и обсуждение

Данные о влиянии электростимуляции гипоталамуса на УР фракций РНК приведены в таблице, из которой видно, что уже через 1½ ч после стимуляции наблюдается достоверное возрастание УР РНК-4° (150% по сравнению с контрольным уровнем). УР этой фракции, которая определяется не только уровнем транскрипционных процессов в ядерных структурах, но и скоростью посттранскрипционного процессинга и транспорта РНК из ядра в цитоплазму, продолжает оставаться на высоком уровне в течение всего исследуемого срока, составляя к 7-му часу 172%. Несколько иначе изменяется синтез ядерных РНК. Через 1½ ч после стимуляции наиболее отчетливое повышение УР наблюдается во фракции РНК-85° (193%).

Влияние однократной электростимуляции гипоталамуса на УР фракций РНК печени крыс, имп/мг РНК/мин

Фракция РНК	Статистический показатель	Контроль	Время после электростимуляции, ч			
			1½	3	5	7
РНК-4°	$M \pm m$	11,216 605	16,827* 1,301	17,182 407	15,560* 1,817	19,278* 3,106
РНК-40°	$M \pm m$	57,052 3,560	76,124 5,506	53,781 9,619	103,146* 7,578	68,879 19,554
РНК-55°	$M \pm m$	194,556 32,518	250,324 60,783	91,816* 16,932	262,733 40,143	68,122* 16,170
РНК-63°	$M \pm m$	145,301 33,892	168,890 15,860	101,689 31,088	206,770 30,781	63,594* 13,723
РНК-85°	$M \pm m$	139,975 21,472	243,282* 28,846	95,599 19,486	129,851 22,147	81,743 19,612

* Различия между опытом и контролем достоверны ($P < 0,05$).

Во фракциях РНК-40°, РНК-55° и РНК-63° УР возрастает в меньшей степени и составляет 133, 129 и 116% соответственно. Через 3 ч после стимуляции УР РНК-40° возвращается к исходному уровню (94%), а УР РНК-63° и РНК-55° падает ниже исходного уровня (соответственно 71 и 47%). Через 5 ч интенсивность синтеза РНК-85° (93%) и РНК-63° (103%), судя по сдвигам УР соответствующих фракций, возвращается к исходному уровню, а синтез РНК-40° вновь усиливается (181%). Как и следовало ожидать, во фракции РНК-55°, состоящей из смеси про-рРНК и про-иРНК, повышение УР (135%) было меньшим, чем во фракции РНК-40°, но большим, чем в РНК-63°. Через 7 ч УР всех ядерных фракций, кроме РНК-40° (119%), снова значительно снижается.

Из приведенных данных следует, что УР фракций РНК-55° и РНК-63° подвергается двухфазным изменениям с максимумами через 1½ и 5 ч. Так, возрастание УР, наблюдаемое через 1½ ч после стимуляции гипоталамуса, сменяется некоторым снижением ее к 3-му часу с последующим восстановлением до исходного уровня к 5-му часу и новым снижением к 7-му часу. Если учесть, что УР этих фракций характеризует интенсивность синтеза иРНК и что период полужизни многих видов иРНК составляет 1—2 ч [9], то можно предположить, что гипоталамические механизмы принимают непосредственное участие в процессах тонкой регуляции биосинтеза белка путем изменения скорости синтеза иРНК.

Колебательный характер сдвигов УР сохраняется и во фракции РНК-40°, но в целом рост УР в этой фракции выше. Известно, что ядрышко- вый аппарат, где осуществляется синтез РНК-40°, обладает большей чувстви- тельностью к различным регуляторным факторам, чем другие ядерные струк- туры [10]. Возможно, поэтому при стимуляции гипоталамуса повыше- ние УР РНК-40° держится на более высоком уровне, чем в других ядерных фракциях.

Таким образом, регуляторные влияния с гипоталамуса приводят к неравномерным изменениям син- теза различных фракций РНК.

Ранее на основании примерно- однотипных сдвигов активности ря- да индуцибельных ферментов, наб- людаемых после стимуляции ги- поталамуса и введения АКТГ, а также отсутствия эффекта гипота- ламической стимуляции у адре- налэктомизированных крыс [2] нами было выдвинуто предположение о том, что гипоталамическая стиму- ляция биосинтеза белка в клетках печени осуществляется в основ- ном через гипоталамо-гипофизар- но-адреналовую систему. В усло- виях организма активация коры надпочечников гипоталамусом про- исходит за счет адренокортико- тропного гормона гипофиза. Вот по- чему в следующей серии опытов нами были изучены изменения в синтезе фракций РНК при введе- нии АКТГ. Эти данные были со- поставлены с результатами экспе- риментов по стимуляции гипота- ламуса (рис. 1). Так же как и при стимуляции гипоталамуса, через 1½ ч после введения АКТГ наблю- дается повышение УР всех изучае- мых фракций РНК с последующим восстановлением до исходного уров- ня через 2½—3½ ч. Хотя при раздражении гипоталамуса и вве- дении экзогенных гормонов эндо- кринная ситуация, возникающая в организме, может быть различной, динамика УР фракций РНК в те-

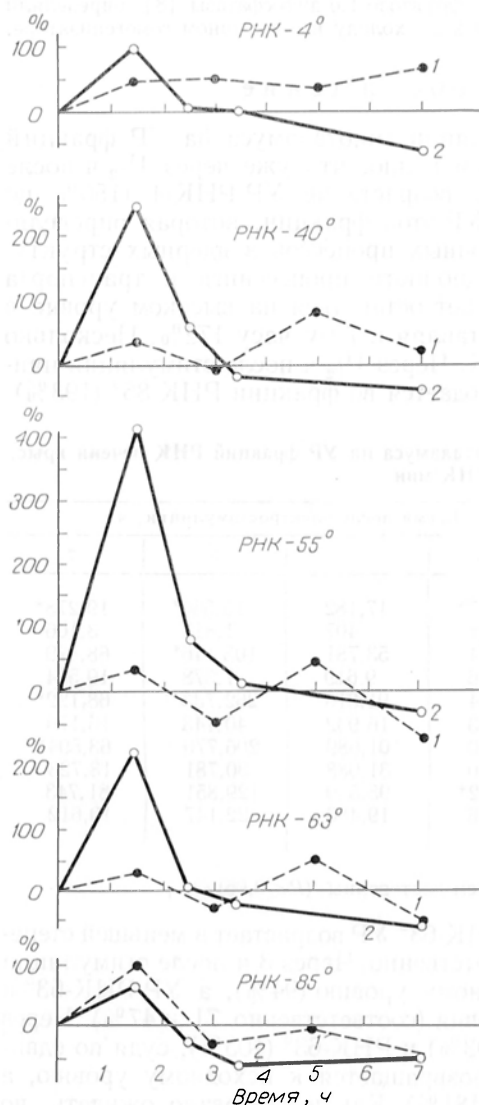


Рис. 1. Изменение УР фракций РНК (в % к контролю) при однократном раздражении гипоталамуса (1) и введении АКТГ (2). Здесь и на рис. 2, 3 кружки — достоверные изменения ($P < 0,05$).

чение первых часов была примерно одинаковой.

Вместе с тем влияние гипоталамуса на биосинтез белка осуществляется, очевидно, не только через кору надпочечников, но и через другие регуляторные пути. Об этом свидетельствует и ряд отличий в синтезе отдельных фракций РНК при введении АКТГ, с одной стороны, и при стимуляции гипоталамуса — с другой. Особенно отчетливо это проявляется при сопоставлении УР цитоплазматической РНК. Так, при введении АКТГ уровень РНК-4° восстанавливается до исходного через 2½ ч, а после раздражения гипоталамуса УР РНК-4° удерживается на высоком уровне до 7-го часа.

Очевидно, гипоталамическая стимуляция биосинтеза белка включает регуляторные механизмы не только на уровне транскрипции, но и процессинга и транспорта РНК из ядра в цитоплазму.

Известно, что гипоталамические механизмы принимают самое непосредственное участие в адаптационно-регуляторных сдвигах, наступающих в организме при различных стрессорных ситуациях. В естественных условиях существования организм нередко подвергается длительным многократным стрессорным воздействиям, вызывающим повторную активацию различных структур гипоталамуса. Для выяснения особенностей длительной гипоталамической стимуляции биосинтеза белка нами были изучены сдвиги УР фракций РНК при 6-дневном раздражении вентромедиального гипоталамуса (рис. 2). Приведенные данные свидетельствуют о том, что при длительном многократном раздражении гипоталамуса наступают неравномерные изменения в синтезе отдельных фракций РНК. Так, УР РНК-4° на 3-й и 6-й дни стимуляции гипоталамуса, как и после однократного раздражения, сохраняется на высоком уровне. Стимуляция синтеза РНК-40°, наблюдаемая в 1-й день раздражения, сменяется постепенным ослаблением синтеза этой фракции (УР РНК-40° к 6-му дню составляет всего 29% исходного уровня). В то же время УР РНК-63° заметно увеличивается к 3-му дню стимуляции и практически возвращается к исходному уровню к 6-му дню. Во фракции РНК-55° наблюдаются менее выраженные сдвиги УР, а во фракции РНК-85° существенные изменения отмечаются лишь на 6-й день раздражения (160%).

Как следует из этих данных, повторные раздражения гипоталамуса могут привести к заметной стимуляции синтеза ряда фракций РНК, в частности иРНК. Наблюдаемое во фракции РНК-63° повышение УР достигает максимального уровня к 3-му дню раздражения (168%), однако к 6-му дню оно становится ниже исходного (75%). Подобное снижение УР РНК-63° может быть следствием как ослабления стимулирующего влияния гипоталамуса, так и результатом неспособности клеток печени длительное время сохранять высокий уровень синтеза иРНК.

Ранее Р. И. Салгаником и соавт. [11, 12] было показано, что при длительной стимуляции генетического аппарата, начиная с определенного момента, наступает фаза своеобразного «истощения» механизмов биосинтеза РНК и белка. Аналогичные данные были получены нами при изучении влияния длительного введения гидрокортизона на УР различных фракций РНК (см. рис. 2). При этом УР РНК-63° сохраняется на высоком уровне до 6-го дня введения гормона, тогда как при электростимуляции гипоталамуса УР РНК-63° падает к этому сроку ниже исходного уровня. Очевидно, более

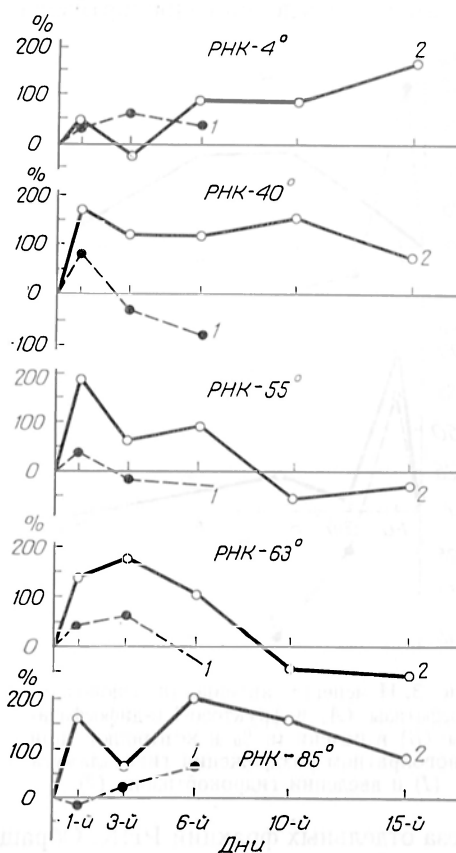


Рис. 2. Изменение УР фракций РНК (в % к контролю) при многократном раздражении гипоталамуса (1) и введении гидрокортизона (2).

быстрое снижение УР РНК-63° при раздражении гипоталамуса обусловлено в основном сдвигами, наступающими в механизмах гипоталамической регуляции, и только отчасти может быть связано с изменениями, происходящими в клетках печени. К такому заключению приводит и сопоставление сдвигов УР РНК-40°, наблюдаемых при длительном раздражении гипоталамуса и введении гидрокортизона. УР этой фракции при введении гидрокортизона сохраняется на высоком уровне до 10—15 дней, а при раздражении гипоталамуса падает ниже исходного уровня уже к 3-му дню.

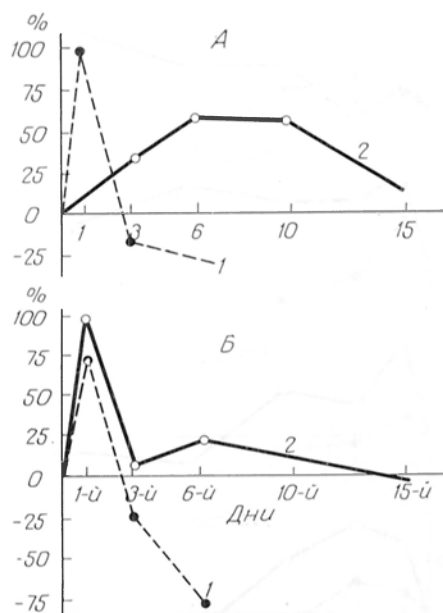


Рис. 3. Изменение активности глюкозо-6-фосфатазы (А) и фруктозо-1,6-дифосфатазы (Б) в печени (в % к контролю) при многократном раздражении гипоталамуса (1) и введении гидрокортизона (2).

теза отдельных фракций РНК. Обращает на себя внимание то, что при однократной стимуляции гипоталамуса наибольшее повышение УР наблюдается во фракции РНК-40°, наименьшее — во фракциях РНК-55° и РНК-63°. При длительной стимуляции гипоталамуса возрастание УР, наоборот, выше во фракции РНК-63°. Сопоставление сдвигов УР фракций РНК и индукции ферментов при длительном введении гидрокортизона и многократном раздражении гипоталамуса позволяет предположить, что потенциальные возможности тканей-мишеней к длительной гормональной стимуляции значительно выше, чем способность гипоталамических структур активировать синтез РНК и ферментов.

Таким образом, одним из лимитирующих звеньев длительной активации генетического аппарата в условиях целостного организма может быть гипоталамический уровень регуляции.

Следует указать, что гормональные сдвиги при стимуляции отдельных ядер гипоталамуса различны [13—15]. В связи с этим можно полагать, что влияние различных гипоталамических структур на биосинтез белка в клетке может быть неодинаковым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фролькис В. В., Безруков В. В., Мурадян Х. К. — «Физиол. ж.», 1974, № 5, с. 646. — 2. Они же. — «Вопр. мед. химии», 1975, № 4, с. 400. — 3. Fífkova E., Marshala I. Stereotaxie podkorových struktur mozku krysy, králíka a kočky. Praha, 1960. — 4. Георгиев Г. П., Мантьева В. Л. — «Биохимия», 1962, № 1, с. 143. — 5. Markov G., Arion W. — «Europ. J. Biochem.», 1973, v. 35,

р. 186. — 6. Прохорова М. И., Тупикова З. Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. Л., 1965. — 7. Haгрег А., Young R. — «Biochem. J.», 1959, v. 71, p. 696. — 8. Weber G., Cantero A. — «Cancer Res.», 1959, v. 29, p. 763. — 9. Олфри В. О., Мирский А. — В кн.: Биосинтез белка и его регуляция. М., 1967, с. 318. — 10. Pradhan D. S. — «Surg. Sci.», 1973, v. 42, № 2, p. 46. — 11. Аргутинский С. В., Кнорре В. Л., Ефимов Л. Ю. и др. — «Молекулярная биол.», 1973, № 6, с. 802. — 12. Мертвецов Н. П., Левитес Е. В., Салганик Р. И. и др. — «Пробл. эндокринолог.», 1971, № 4, с. 92. — 13. Окинака С., Косака К., Кинто А. и др. — В кн.: Центральная регуляция функций эндокринных желез. М., 1971, с. 198. — 14. Кацуки С., Ито М., Ватанабэ Ф. и др. — Там же, с. 38. — 15. Szentagothai J. et al. (Eds) Hypothalamic Control of the Anterior Pituitary. Budapest, 1968.

Поступила 15/IV 1977 г.

SYNTHESIS OF RNA FRACTIONS IN RAT LIVER TISSUE IN SINGLE AND REPEATED STIMULATION OF HYPOTHALAMUS

V. V. Frol'kis, V. V. Bezrukov, Kh. K. Muradyan

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Kiev

Specific radioactivity of RNA from rat liver tissue, labelled with ^{14}C -orotic acid and fractionated using thermic phenol method, was altered dissimilarly. In single stimulation of hypothalamus the specific radioactivity of nuclear RNA was more increased in RNA-40^o fraction than in RNA-55^o and RNA-63^o ones. A decrease in synthesis of nuclear RNA fractions followed the phase of activation in repeated stimulation of hypothalamus. The distinct increase in specific radioactivity was observed in cytoplasmic RNA (RNA-4^o) both in single and repeated stimulation of hypothalamus. The stimulating effect of the prolonged hypothalamus irritation on synthesis of the RNA fractions and on activity of glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-diphosphatase disappeared more rapidly than this effect in long-term administration of hydrocortisone. The data obtained suggest that sensitivity of tissue-targets to prolonged hormonal stimulation is distinctly higher than the ability of hypothalamus to activate the synthesis of RNA and enzymatic proteins.

УДК 612.118.223:612.111.7

О. А. Горюхина, А. А. Ткаченко

ВЫДЕЛЕНИЕ КАТИОННЫХ БЕЛКОВ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ КРОВИ КРОЛИКОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Лаборатория химии белка и кафедра микробиологии Ленинградского университета и м.
А. А. Жданова

Методом избирательной экстракции из тромбоцитов крови кроликов выделены катионные белки, обладающие бактериостатической активностью в отношении грамположительного микроорганизма *Bacillus subtilis* SII gw. Катионные белки тромбоцитов гетерогенны (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) и содержат 2 группы белков с молекулярными массами порядка $8-10 \cdot 10^3$ и $20-30 \cdot 10^3$ дальтон. Изучение бактериостатической активности каждой группы белков, полученных после разделения суммарного препарата гель-фильтрацией на сефадексе G-75, показало, что за бактериостатическую активность суммарного катионного белка тромбоцитов ответственна группа белков с молекулярной массой $8-10 \cdot 10^3$ дальтон.

Одним из факторов сыворотки крови, ответственных за бактерицидные свойства последней в отношении грамположительных микроорганизмов, является бета-лизин [1], представляющий собой относительно термостабильный катионный белок [2, 3]. Имеются косвенные данные, указывающие, что первичным источником бета-лизина являются тромбоциты [2]. В 1970—1972 гг. Векслер и Нахман опубликовали данные по изучению биологических свойств кислоторастворимых белков лизосом тромбоцитов животных и человека. Показано, что катионные белки кислотного экстракта лизосом обладают бактерицидностью в отношении грамположительных микроорганизмов и увеличивают проницаемость сосудов путем воздействия гистамина, выделяющегося из тучных клеток [4—6].

Таким образом, тромбоциты, как и лейкоциты, являются уникальными клетками, обладающими экссудативной функцией, которая позволяет им играть роль медиаторов при воспалительном процессе.

Целью настоящей работы явилось выделение и фракционирование катионных белков из тромбоцитов крови кроликов и изучение их бактериостатических свойств в отношении грамположительного микроорганизма *Bacillus subtilis*.

М е т о д ы

Тромбоциты получали из цитратной крови нормальных кроликов, используя метод Векслера и Нахмана [5], а также некоторые наши модификации. Лейкоциты отделяли при центрифугировании суспензии тромбоцитов в растворе 0,1% ЭДТА — 0,9% NaCl pH 7,0 в течение 2 мин при 250 g. Из надосадочной жидкости тромбоциты осаждали при 1500 g в течение 30 мин. Процедуру повторяли 2—3 раза. Полный гемолиз эритроцитов наступал после ряда мягких гомогенизаций осадка тромбоцитов в растворе 0,01 M трис — 3 mM CaCl₂ pH 7,0. Каждый раз тромбоциты осаждали из раствора при 1500 g в течение 30 мин. Окраску тромбоцитов проводили по Гимзе — Романовскому. Загрязнение препарата ретикулоцитами не превышало 1 клетки на 10³ тромбоцитов. Кислоторастворимые белки из тромбоцитов экстрагировали 0,25 н. HCl при озвучивании суспензии (0,3 мА, 60 с; генератор УЗДН-1). Суспензию центрифугировали 15—20 мин при 1200 g, осадок отбрасывали. Из надосадочной жидкости белки осаждали ацетоном (10 объемов), выдерживали 1 ч при 4°C, отделяли при 1500 g и промывали 3—4 раза ацетоном. Осадок высушивали под вакуумом. Ацетоновый порошок кислоторастворимых белков тромбоцитов, обозначенный нами как исходный препарат, хранили при 4°C в течение нескольких недель. Фракцию катионных белков, извлекаемых из ацетонового порошка (1:10 вес/объем) 0,1 н. HCl (препарат I) или 0,01 M фосфатным буфером pH 6,4—0,15 M NaCl (препарат II) при перемешивании на магнитной мешалке в течение 2—3 ч, использовали для изучения бактериостатической активности.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПАГ) проводили по методу Паньим и Чалкли [7] в течение 2 или 4 ч при силе тока 1,8 мА на трубку, буфер — 0,9 н. CH₃COOH. Гели окрашивали 0,05% раствором Кумасси или 0,1% раствором амидо черного.

Молекулярную массу выделенных препаратов белков определяли методом гель-фильтрации на сефадексе G-75. В качестве стандартов использовали бычий сывороточный альбумин, РНК-азу, инсулин. Содержание белка определяли методом Лоури [8].

Бактериостатическое действие кислоторастворимых белков тромбоцитов изучали в отношении грамположительного микроорганизма *Bacillus subtilis* SH gw. Культуру выращивали на мясо-пептонном бульоне в течение 18 ч при 30°C. Клетки отделяли при 250 g в течение 10 мин и суспендировали в 0,01 M фосфатном буфере pH 6,4—0,15 M NaCl с таким расчетом, чтобы поглощение исходной суспензии при 650 нм составляло 0,2—0,9 ед. оптической плотности. Затем бактериальную суспензию разводили фосфатным буфером в отношении 1:100 и 1:1000 и отбирали по 5 мл суспензии для инкубации с 0,2—1,0 мл исследуемого раствора белка. Инкубацию проводили в течение 2 ч при 37°C. В качестве контрольной пробы использовали суспензию бактериальных клеток, которую инкубировали при тех же условиях с буфером соответствующего объема. Число выживших бактерий устанавливали путем подсчета колоний на мясо-пептонном агаре.

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

Электрофорез в ПАГ кислоторастворимого белка тромбоцитов после растворения исходного препарата в 10 M растворе мочевины выявил его высокую гетерогенность (рис. 1, а). Большое количество белковых полос, сгруппированных вблизи анода, указывает на присутствие в исходном препарате кислых белков. По-видимому, при прямой экстракции 0,25 н. HCl катионных белков из тромбоцитов в раствор увлекается часть кислых белков. Этими белками могут быть так называемые плазменные белки тромбоцитов, которые связаны с наружной мембраной [9]. Это заключение подтверждается данными о том, что более 50% белка исходного препарата не связываются материалом колонки при фракционировании на катионообменнике (КМЦ). Об этом же свидетельствуют данные Векслера и Нахмана [5], которые для очистки кислотного экстракта тромбоцитов кролика использовали метод ионообменной хроматографии. В этом случае при хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в первую очередь элюировалась фракция катионных белков.

Вместе с тем оказалось, что при растворении исходного препарата в 0,1 н. HCl в раствор переходила только часть белков (42% от навески) — пре-

парат I. Электрофоретический спектр препарата I также неоднороден и содержит 2 резко различающиеся по подвижности группы белков (рис. 1, б). Условно мы обозначили на электрофореграммах медленно мигрирующие к катоду белки как белки группы М (>10 белковых полос), а быстро мигрирующие к катоду как белки группы Б (3 белковые полосы). Последующая гель-фильтрация на сефадексе G-75 препарата I позволила разделить эти 2 группы белков (для элюирования использовали 0,01 и. НСI). В первом белковом пике, на долю которого приходилось до 90% белка, содержались белки группы М. Оставшиеся 10% белка, которые элюировались с колонки значительно позднее (в объеме колонки), при электрофорезе в ПАГ обнаруживали в своем составе быстро мигрирующие к катоду белки группы Б.

Еще большую степень избирательности извлечения катионных белков из исходного препарата удалось получить при растворении его в 0,01 М фосфатном буфере рН 6,4. Хотя электрофоретический спектр извлекаемых в этом случае белков (препарат II) принципиально не отличался от спектра препарата I, было заметно резкое уменьшение числа белковых полос в группе белков М (>5 белковых полос) наряду с сохранением всех полос, характерных для группы белков Б препарата I (рис. 1, в). В соответствии с этим при гель-фильтрации на сефадексе G-75 белки препарата II выходят в виде 2 белковых пиков с равным содержанием белка в каждом пике. Электрофоретический спектр белков каждой группы, полученных при гель-фильтрации препарата II, представлен на рис. 2. При оценке молекулярной массы методом гель-фильтрации на сефадексе G-75 показано, что первый пик содержит белки с молекулярной массой порядка $20-30 \cdot 10^3$, а второй — порядка $8-10 \cdot 10^3$ дальтон.

Приготовленные таким способом растворы катионных белков тромбоцитов могут быть непосредственно использованы в системах для определения их биологических эффектов. С другой стороны, в препарате II в эквивалентном количестве представлены белки обеих групп. Поэтому в дальнейшем, в опытах по изучению бактериостатического действия катионных белков тромбоцитов, мы использовали только препараты II, несмотря на то что последние составляли не более 10—12% исходного препарата (по содержанию белка).

Данные по изучению бактериостатического действия катионных белков тромбоцитов в отношении *Bacillus subtilis* SH gw представлены в таблице.

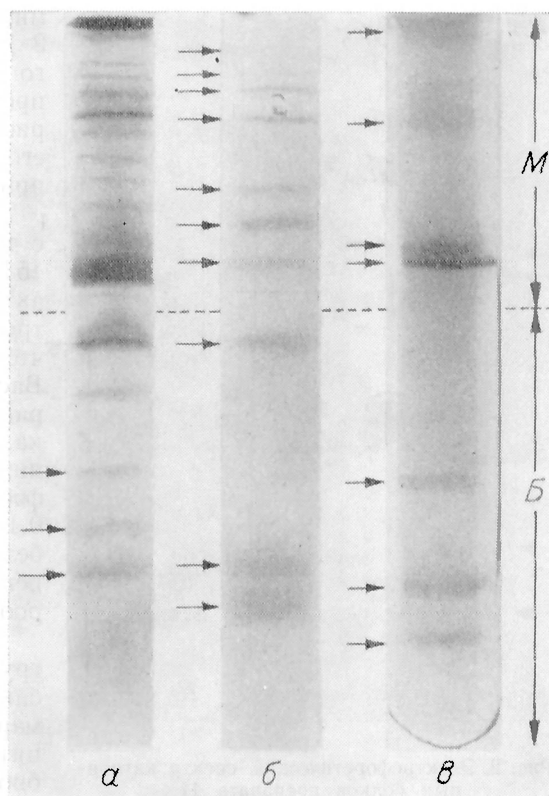


Рис. 1. Электрофоретический спектр катионных белков тромбоцитов крови кроликов.

а — исходный препарат; б — препарат I; в — препарат II.

Б и М — группы белков.

Условия электрофореза: сила тока — 1,8 мА; время — 2 ч; окрашивание гелей 0,1% раствором амидо черного (а, б) или 0,05% раствором Кумасси (в).

Максимальный эффект подавления роста колоний для разных препаратов всегда обнаруживался в одном диапазоне концентраций белка. Показано, что при концентрации белка 8—37 мкг на 1 мл бактериальной суспензии погибает до 80 % микроорганизмов. Эффект подавления роста колоний был

одинаковым при концентрации микроорганизмов в пределах $3 \cdot 10^2$ — $3 \cdot 10^4$ на 1 мкг исследуемого белка. Однако исследуемый препарат полностью теряет бактериостатическую активность после его предварительного прогревания при 80°C в течение 30 мин.

Эти результаты согласуются с данными Векслера и Нахмана [5] в отношении бактерицидной активности кислотного экстракта тромбоцитов. Авторы показали, что при добавлении к суспензии *Bacillus subtilis* кислотного экстракта тромбоцитов крови кролика, после предварительного диализа экстракта против 0,01 М фосфатного буфера pH 5,6—0,15 М NaCl в количестве 5 мкг белка на 1 мл бактериальной суспензии погибает более 50 % микроорганизмов.

Чтобы установить, какая группа белков ответственна за бактериостатические свойства суммарного катионного белка тромбоцитов, мы проводили определение биологической активности белков группы М, полученных при гель-фильтрации на сефадексе G-75, как препарата I, так и препарата II. Как уже отмечалось выше, на долю белков группы М в пре-

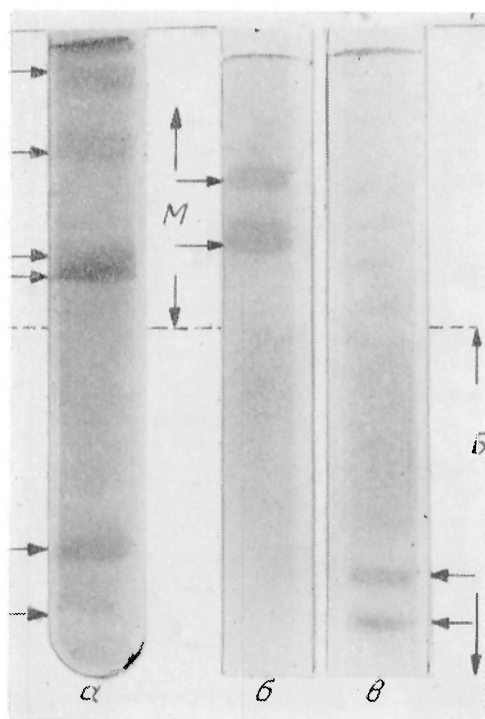


Рис. 2. Электрофоретический спектр катионных белков препарата II.

а — суммарный препарат II; б — белки группы М препарата II; в — белки группы Б препарата II. Условия электрофореза: сила тока — 1,8 мА; время — 4 ч; окрашивание гелей 0,05 % раствором Кумасси.

парате I приходится 90 %, а в препарате II — 50 % белка. Оказалось, что белки группы М, выделенные из обоих препаратов, не обладают бактериостатической активностью при концентрации белка 8—15 мкг на 1 мл бактериальной суспензии (см. таблицу, опыт 1). Эти данные позволяют предполагать, что за бактериостатические свойства катионного белка тромбоцитов кролика ответственны низкомолекулярные белки — белки группы Б. Для решения этого вопроса в отдельном эксперименте было проведено сравнительное изучение бактериостатической активности обеих групп белков, полученных при гель-фильтрации препарата II. В этом опыте (см. таблицу, опыт 5) бактериостатическая активность препарата II составляла 50 % при концентрации белка 37 мкг на 1 мл бактериальной суспензии (в данном случае концентрация микроорганизмов была высокой — $3 \cdot 10^5$ на 1 мкг белка). При добавлении к бактериальной суспензии белков группы М подавление роста колоний не наблюдалось, вместе с тем белки группы Б обладали выраженной бактериостатической активностью (более 50 % эффекта) при такой же концентрации белка — 14 мкг на 1 мл бактериальной суспензии.

Таким образом, методом избирательного извлечения (0,01 М фосфатный буфер pH 6,4) из кислоторастворимого экстракта белков тромбоцитов крови кролика (ацетоновый порошок 0,25 г. HCl экстракта) выделена фракция катионных белков, обладающая бактериостатической активностью в от-

ношении грамположительного микроорганизма *Bacillus subtilis* SH gw. По данным электрофореза в ПАГ фракция катионных белков тромбоцитов гетерогенна и содержит 2 группы белков, резко различающихся по электрофоретической подвижности. В соответствии с этим методом гель-фильтрации на сефадексе G-75 фракция катионных белков была разделена на 2 группы белков с молекулярной массой порядка $8-10 \cdot 10^3$ и $20-30 \cdot 10^3$ дальтон. Изучение бактериостатической активности каждой группы белков показало, что за бактериостатические свойства суммарного препарата тромбоцитов ответственна группа белков с молекулярной массой $8-10 \cdot 10^3$ дальтон.

Бактериостатическое действие катионных белков тромбоцитов крови кроликов на грамположительный микроорганизм *Bacillus subtilis* SH gw

№ опыта	Исследуемый препарат белка ¹	Количество белка, добавленного к 1 мл бактериальной суспензии, мкг	Количество клеток, млн/мл ($M \pm m$)	
			в исходной бактериальной суспензии (контроль)	в бактериальной суспензии после инкубации с белком (опыт)
1	I (группа белков M)	8	$24 \cdot 10^{-2} \pm 6,2 \cdot 10^{-2}$	$23 \cdot 10^{-2} \pm 4,4 \cdot 10^{-2}$
	I (группа белков M)	15	$20,8 \pm 2,95$	$14,8 \pm 2,56$
2	II	8	$24 \cdot 10^{-2} \pm 6,2 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-2} \pm 0,7 \cdot 10^{-2}$
3	II	20	$90 \cdot 10^{-4} \pm 10 \cdot 10^{-4}$	$17 \cdot 10^{-4} \pm 3,0 \cdot 10^{-4}$
4	II	37	$10 \cdot 10^{-4} \pm 2,6 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$
	II	37	$11,4 \pm 1,16$	$5,7 \pm 0,7$
5	II (группа белков M)	14	$20,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,6 \cdot 10^{-2}$	$18,0 \cdot 10^{-2} \pm 2,4 \cdot 10^{-2}$
	II (группа белков B)	14	$20,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,6 \cdot 10^{-2}$	$8,0 \cdot 10^{-2} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$

¹ Расшифровку обозначений белковых препаратов см. в тексте.

В настоящее время принято считать, что вещества основной природы, прикасаясь с поверхностью клеток, действуют как бактерицидные детергенты, нарушающие целостность осмотического барьера клетки и приводящие к неспецифическому увеличению проницаемости цитоплазматической мембраны. Не исключено, что антимикробное действие катионных белков тромбоцитов крови кроликов связано с увеличением проницаемости цитоплазматической мембраны микроорганизмов.

В литературе имеются многочисленные данные о влиянии катионных агентов на микроорганизмы [10, 11]. Показано, что гистоны и протамины оказывают летальный эффект на *E. coli* [12, 13], а контакт низкомолекулярного основного белка бета-лизина, выделенного из сыворотки, с клетками *Bacillus subtilis* приводит к разрыву протопластов [14, 15]. С другой стороны, анионные фосфолипиды нейтрализуют вызванное гистонами набухание митохондрий [16] точно так же, как и антибактериальное действие бета-лизина [17]. Данные по изучению действия различных катионных бактерицидных агентов (гистонов, протаминов и бета-лизина) на мембраносвязанную Mg^{2+} -зависимую АТФ-азу *Bacillus subtilis* показали, что все эти агенты стимулируют активность фермента, взаимодействуя со встроенными в мембрану полианионными структурами [18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Skarnes R. C., Watson D. W. M. — «Bact. Rev.», 1957, v. 24, p. 273. —
2. Johnston F. B., Donaldson D. M. — «J. Bact.», 1968, v. 96, p. 589. —
3. Mogi N. — «Nihon. Univ. med. J.», 1970, v. 12, p. 215. — 4. Nachman R. L., Weksler B., Ferris B. — «J. clin. Invest.», 1970, v. 49, p. 274. — 5. Weksler B., Nachman R. L. — «J. exp. Med.», 1971, v. 134, p. 1114. — 6. Nachman R. L., Weksler B., Ferris B. — «J. clin. Invest.», 1972, v. 51, p. 549. —

7. Panyim S., Chalkley R. — «Arch. Biochem.», 1969, v. 130, p. 337. — 8. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 9. Балуда В. П., Ширяев В. В. — «Успехи совр. биол.», 1974, т. 78, с. 371. — 10. Ашмарин И. П., Ждан-Пушкина С. М., Кокряков В. Н. и др. — «Изв. АН СССР», Серия биол., 1972, № 4, с. 502. — 11. Ждан-Пушкина С. М. — «Научн. докл. высш. школы. Биол. науки», 1973, № 8, с. 82. — 12. Hirsch J. G. — «J. exp. Med.», 1958, v. 103, p. 68. — 13. Harold F. M. — «Advanc. Microbiol.», 1970, v. 4, p. 45. — 14. Matheson A., Donaldson D. M. — «J. Bact.», 1968, v. 95, p. 1892. — 15. Idem. — Ibid., 1970, v. 101, p. 314. — 16. Schwartz A., Johnson C. L., Starbuck W. C. — «J. biol. Chem.», 1966, v. 241, p. 4505. — 17. Joos R. W., Hall W. H. — «J. Bact.», 1968, v. 95, p. 9. — 18. Rosenthal S. L., Matheson A. — «Biochim. biophys. Acta», 1974, v. 363, p. 141.

Поступила 10/III 1977 г.

ISOLATION OF CATION-CONTAINING PROTEINS FROM THROMBOCYTES OF RABBIT BLOOD AND THEIR BACTERIOSTATIC ACTIVITY

O. A. Goryukhtna, A. A. Tkachenko

Laboratory of Protein Chemistry, Chair of Microbiology, A. A. Zhdanov State University, Leningrad

Cation-containing proteins, which possessed the bacteriostatic activity against Gram-positive microorganism *Bacillus subtilis* SHGW, were isolated from rabbit thrombocytes by means of selective extraction. These substances were of heterogenous nature (as shown by polyacrylamide gel disc electrophoresis), including two groups of proteins with molecular weight about $8 \cdot 10^3$ and $20 \cdot 10^3$ daltons. The bacteriostatic activity of each group of these proteins was studied after gel filtration of the total preparation on Sephadex G=75. The group of proteins with molecular weight $8 \cdot 10^3$ daltons was responsible for bacteriostatic activity of the total cation-containing protein from thrombocytes.

УДК 616.151.11-02:616-005.1-07:616.36-008.9-07

Е. В. Сковронская

МЕТАБОЛИЗМ ПЕЧЕНИ ПРИ МАССИВНОЙ КРОВОПОТЕРЕ И ЕЕ ВОЗМЕЩЕНИИ

Экспериментальный отдел Научно-исследовательского института гематологии и переливания крови, Львов

В экспериментах на белых крысах и собаках исследовали концентрацию лактата, пирувата, активность гексокиназы, фосфорилаз, АТФ-азы, трансаминаз в печени при массивной острой кровопотере и ее полном возмещении аутокровью, изогенной кровью и 0,9% NaCl. Массивная кровопотеря приводит к резкому угнетению гексокиназной активности, что влечет за собой нарушение утилизации глюкозы печенью и развитие гипергликемии. Выявлена прямая зависимость между изменениями артериального давления и активности тканевых ферментов. Восполнение кровопотери адекватным количеством крови в ранний период шока восстанавливает объем циркулирующей крови и улучшает тканевый метаболизм.

При массивной кровопотере развиваются гипоксия печени и ее функциональная недостаточность, проявляющаяся прежде всего нарушениями белкового и углеводного обмена [1—4].

При геморрагическом шоке значительно снижается кровоток через сосуды печени при одновременном повышении сопротивления за счет сокращения капилляров [5]. При этом нарушается потребление кислорода печеночными клетками [6], понижается общая проницаемость сосудов в направлении кровь — ткань [7]. Микроциркуляция в синусоидах печени прекращается при 30% кровопотере. Остановка микроциркуляции наступает постепенно и является обратимой в течение 12 мин [8].

Таким образом, в печени при кровопотере создаются условия, при которых в этом органе нарушается обмен веществ, что приводит к тяжелому расстройству метаболизма в целом организме. С нарушениями гемодинамики и кислородного режима тесно связаны изменения ультраструктуры печеночных клеток [9] и морфологические расстройства [10].

Главными показателями, характеризующими тяжесть постгеморрагического состояния, принято считать нарушение гемодинамики, повышение уровня лактата, пирувата и глюкозы в крови [2, 11, 12]. Вместе с тем не выяснен ряд вопросов, касающихся компенсаторных биохимических возможностей печени при кровопотере и последующей гемотрансфузии.

В предыдущих исследованиях нами было показано, что переливание изогенной крови в дозе 5 мл/кг веса вызывает существенные изменения углеводного, белкового обмена, а также многих ферментных систем в тканях [13—15]. В развитие указанных исследований мы поставили перед собой задачу изучить особенности метаболизма печени при массивной кровопотере и ее полном возмещении ауто- и изогенной кровью, сопоставить изменения тканевого метаболизма с некоторыми биохимическими показателями крови, выяснить прогностическую значимость этих показателей в эффективности гемотрансфузии.

М е т о д и к а

Опыты проведены на 75 белых крысах и 35 собаках. У животных вызывали острую массивную кровопотерю (50% общего объема крови). У белых крыс полное возмещение кровопотери проводили аутокровью или 0,9% NaCl через 2 ч после кровопотери. Животных забивали через час после инфузий. Контролем служили крысы, которым делали кровопускание без возмещения кровопотери. Во все периоды исследовали объем циркулирующей крови (ОЦК). Опыты у собак проводили под контролем показателей кровяного давления и дыхания. При умеренно быстром кровопускании (200 мл за 5 мин) кровяное давление снижалось в течение 15—20 мин до 40—20 мм рт. ст. При этом у животных развивалась однотипная постгеморрагическая реакция со смертельным исходом; продолжительность жизни собак составляла несколько часов.

В разные фазы геморрагического шока животных умерщвляли, печеночную ткань брали для исследования. В опытах с полным возмещением кровопотери аутокровью или изокровью (консервант ЦОЛИПК 76 — срок хранения до 3 дней) наблюдения продолжались до 48 ч и ограничивались исследованием крови.

У животных определяли ОЦК [16], количество внеклеточной жидкости [17], концентрацию лактата [18], пирувата [19], глюкозы [20], активность гексокиназы — КФ 2.7.1.1 [21], фосфорилз — КФ 2.4.1.1 [22], трансаминаз — КФ 2.6.1.1 и КФ 2.6.1.2 [23], аденозинтрифосфатазы — КФ 3.6.1.3 [24]. Экстракты гомогенатов печени готовили на холоде сразу после декапитации животных в соответствующих растворах, согласно методикам. После 30-минутной экстракции гомогенаты центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов.

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

ОЦК у белых крыс до кровопотери составлял $11,5 \pm 0,6$ мл/100 г веса тела. Через 3 ч после массивной кровопотери ОЦК уменьшался и достигал $5,6 \pm 0,2$ мл/100 г веса. В результате полного возмещения кровопотери равным количеством аутокрови ОЦК у крыс увеличивался до $11,1 \pm 0,7$ мл/100 г веса и удерживался на этом уровне в течение часа. При замещении кровопотери 0,9% NaCl ОЦК достигал $9,3 \pm 1,2$ мл/100 г веса.

Показатели метаболизма печени исследовали после кровопотери при значительном снижении ОЦК, а также после нормализации объема циркулирующей крови.

Активность гексокиназы в печени снижалась после кровопотери на 42,4% по сравнению с таковой до кровопотери (см. таблицу). Через час после возмещения кровопотери аутокровью или солевым раствором активность фермента несколько повышалась, но не достигала нормальных величин. Известно, что активность гексокиназы в значительной мере зависит от нейрогуморальных факторов регуляции и угнетается при аварийных состояниях [25]. При острой кровопотере существенное угнетение гексокиназной активности отмечено также в различных отделах головного мозга и скелетной мышце кроликов [26]. Причиной этого являются нарастание гипоксии тканей и активация симпатико-адреналовой системы после кровопотери. По всей вероятности, угнетение гексокиназной активности в печени после массивной кровопотери снижает утилизацию глюкозы тканью,

что является одной из причин гипергликемии, наблюдаемой при постгеморрагических состояниях [11].

Восстановление ОЦК аутогемотрансфузией не нормализует процесса, ответственного за включение глюкозы в последующие пути гликолиза. Острая массивная кровопотеря приводит к существенному повышению активности фосфорилазы в печени белых крыс. Следует отметить, что повышение общей фосфорилазной активности (фосфорилазы *t*) происходит в основном за счет неактивной ее формы. После аутогемотрансфузии или введения

Изменение показателей метаболизма печени белых крыс после массивной кровопотери и ее возмещения ($n=10-13$): $M \pm m$

Исследуемый показатель	Кровопотеря		Возмещение кровопотери	
	до	после	аутокровью	физиологическим раствором
Гексокиназа, мкмоль глюкозы на 1 мг белка	$0,26 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,02^*$	$0,20 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,5$
Фосфорилаза «а», мкатом фосфора на 1 мг белка	$0,15 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$
Фосфорилаза «t» мкатом фосфора на 1 мг белка	$0,21 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,02^*$	$0,23 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,03$
Молочная кислота, мг	$86,0 \pm 8,50$	$72,7 \pm 12,7$	$70,6 \pm 15,9$	$78,5 \pm 17,2$
Пировиноградная кислота, мг	$0,83 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,04^*$	$0,56 \pm 0,09^*$	$0,60 \pm 0,07^*$
Аспартат-аминотрансфераза, мкмоль пирувата на 1 мг белка	$6,99 \pm 0,34$	$10,68 \pm 0,26^*$	$4,30 \pm 0,48^*$	$3,96 \pm 0,47^*$
Аланин-аминотрансфераза, мкмоль пирувата на 1 мг белка	$7,07 \pm 0,50$	$16,23 \pm 1,44^*$	$7,12 \pm 0,31$	$7,20 \pm 0,41$
Аденозинтрифосфатаза, мкатом фосфора на 1 мг белка	$0,26 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,01^*$	$0,23 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$

* $P < 0,05$ по сравнению с данными до кровопотери.

солевого раствора активность фосфорилазы *t* снижается до исходной, уровень фосфорилазы *a* не меняется. Соотношение активности фосфорилаз ($\frac{a}{t} \times 100$) при этом практически не меняется, составляя при аутогемотрансфузии 60, а при введении солевого раствора 62. Следовательно, восстановление

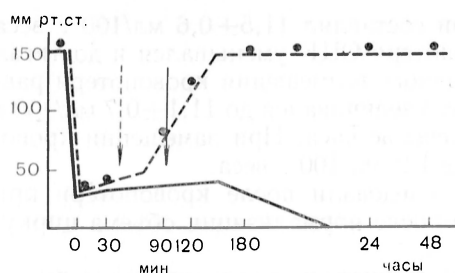


Рис. 1. Изменения артериального давления у собак после кровопотери и ее возмещения. Прерывистая линия — артериальное давление после изогемотрансфузии в ранний период шока (через 30 мин после кровопотери); сплошная — в поздний период шока (через 90 мин после кровопотери); стрелками указано время гемотрансфузии, точками — время исследования тканей и крови.

ОЦК препятствует дальнейшему расходованию гликогена печени. Необходимо подчеркнуть, что увеличение активности фермента, ответственного за начальную стадию распада гликогена, является характерной реакцией печени при различных воздействиях [27]. В результате количество гликогена в гепатоцитах существенно снижается, что было отмечено после массивной кровопотери [28].

Концентрация лактата в печени через 3 ч после кровопотери существенно не меняется, уровень ее остается стабильным и через час после возмещения кровопотери. Содержание пировиноградной кислоты в печени через 3 ч после кровопотери уже снижается и составляет 68,4% исходного. При этом соотношение лактат/пируват в печеночной ткани увеличивается, оставаясь на том же уровне после аутогемотрансфузии и введения солевого раствора.

Таким образом, при острой кровопотере в печени возникает кислородная задолженность, которая не ликвидируется полным восстановлением ОЦК.

При острой массивной кровопотере изменяется активность ферментов, ответственных за процессы трансаминирования в печени, резко возрастает активность аспартат-(АСТ) и аланин-(АЛТ) аминотрансфераз, достигая соответственно 152,7 и 233,33%. После возмещения кровопотери активность АЛТ возвращается к норме, активность АСТ резко угнетается.

Активность АТФ-азы в печени после кровопотери увеличивается на 53,8%. После возмещения кровопотери и восстановления ОЦК активность этого фермента возвращается к исходной. Восстановление процессов гидролиза макроэргических соединений после возмещения кровопотери можно рассматривать как результат ауторегуляции, направленной на компенсацию обменных процессов после временного аварийного состояния.

Проведенные исследования дают основание считать, что острая массивная кровопотеря приводит к существенному нарушению изучаемых показателей в печени. Возмещение кровопотери аутокровью, восстанавливая ОЦК, не приводит к полной нормализации нарушенного тканевого метаболизма в печени белых крыс.

Изменение метаболизма печени в зависимости от динамики артериальной гипотонии при геморрагическом шоке изучено у собак. Динамика артериальной гипотонии при острой кровопотере и ее возмещении, а также время исследования количества внеклеточной жидкости и биохимических показателей печени собак представлены на рис. 1.

До кровопотери количество внеклеточной жидкости составляло $453,3 \pm 38,6$ мл/кг веса, в конце кровопотери уменьшилось на $31,6 \pm 6,0$ мл/кг ($P < 0,05$). В период стабилизации кровяного давления дефицит внеклеточной жидкости уменьшался и составлял $23,8 \pm 14,0$ мл/кг. По-видимому, в этот период из тканей диффундирует внутриклеточная жидкость, частично возмещая утраченную из кровяного русла. Вместе с тканевой жидкостью в

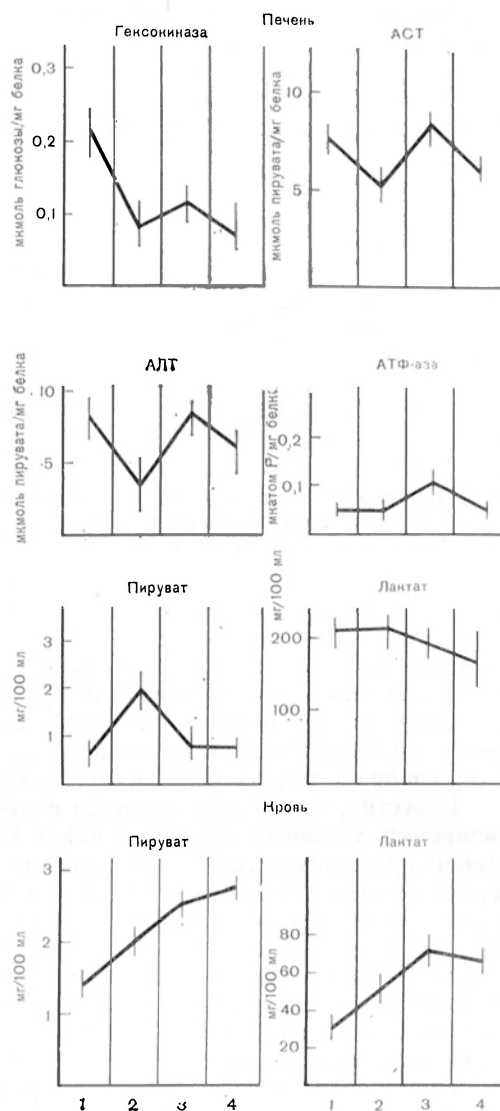


Рис. 2. Биохимические показатели печени и крови собак при кровопотере в различные периоды артериальной гипотонии.

1 — до кровопотери; 2 — сразу после кровопотери при кровяном давлении 20—30 мм рт. ст.; 3 — период стабилизации кровяного давления (40—60 мм рт. ст.); 4 — период повторного падения кровяного давления (20—0 мм рт. ст.). Вертикальные линии на кривых — средняя ошибка.

кровеное русло частично проникают углеводы и азотистые вещества, в результате чего абсолютной клеточной дегидратации не наступает. Об этом свидетельствует неизменный сухой остаток ткани через 3 ч после кровопотери (до кровопотери он составлял $25,4 \pm 0,8\%$, после кровопотери — $25,1 \pm 0,8\%$).

Динамика количества внеклеточной жидкости у собак после аутогемотрансфузии свидетельствует о том, что полное восполнение кровопотери не приводит к ликвидации дефицита сосудистой и интерстициальной жидкости. В период стабилизации кровяного давления и через час после аутогемотрансфузии уровень внеклеточной жидкости практически не меняется (до аутогемотрансфузии — $423,4 \pm 57,2$ мл/кг, после аутогемотрансфузии — $438,1 \pm 33,9$ мл/кг веса; $P > 0,05$). Изменения показателей метаболизма печеночной ткани у собак представлены на рис. 2.



Рис. 3. Изменения биохимических показателей в крови после гемотрансфузии при различном исходе геморрагического шока.

1 — через 30 мин после изогемотрансфузии;
2 — через 60 мин после изогемотрансфузии.

Активность гексокиназы в печени собак угнетается сразу после кровопотери при падении кровяного давления до 30—20 мм рт. ст. и удерживается на низком уровне в последующие периоды исследования, т. е. на протяжении 90 мин. Эти данные дополняют результаты, полученные у белых крыс через 3 ч после кровопотери, и свидетельствуют о зависимости угнетения активности гексокиназы от снижения кровяного давления.

Развивающаяся гипоксия тканей приводит к быстрому и продолжительному нарушению использования глюкозы тканью печени.

Сразу после кровопотери содержание в печени молочной кислоты меняется незначительно, концентрация пирувата увеличивается почти вдвое, в дальнейшем возвращаясь к исходным величинам.

Известно, что печень является единственным органом, способным утилизировать молочную кислоту в цикле Кори. По-видимому, при острой массивной кровопотере лактат не используется печеночной тканью и диффундирует из печени в кровь. Лактат и пируват как низкомолекулярные соединения легко проникают через клеточные мембраны и могут поступать из ткани в кровь даже при незначительном повышении их концентрации. Благодаря этому в печени удерживается невысокий уровень метаболитов, что препятствует дезорганизации клеточного обмена. Так, при выраженной гипоксии ткани нами отмечен невысокий уровень лактата и пирувата в печени, тогда как содержание их в крови резко увеличивается.

При кровопотере наблюдается отчетливая зависимость между изменениями кровяного давления и активностью трансаминаз печени. Сразу после кровопотери активность АСТ и АЛТ угнетается почти на 50%, возвращаясь к исходной величине в период стабилизации кровяного давления. В последующей фазе артериальной гипотонии, когда кровяное давление необратимо снижается, наступает угнетение активности трансаминаз, что свидетельствует о причинно-следственном характере изменений активности этих ферментов и гипотонии.

Следует отметить, что полного параллелизма между изменениями активности трансаминаз в печени собак и крыс нами не выявлено. Это объясняется различным сроком исследования печени. Так, у крыс активность трансаминаз изучалась через 3 ч, а у собак — через 5 мин после остановки кровопотери.

На основании полученных данных можно предположить, что в ранний период геморрагического шока метаболические нарушения обратимы, ком-

пенсаторные механизмы в состоянии нормализовать тканевый обмен, особенно, когда восстановлен ОЦК.

Выживаемость собак после кровопотери в значительной мере зависела от срока последующей гемотрансфузии. При переливании крови в ранней стадии гипотонии выживали все животные, в позднем периоде — 23% ($P < 0,05$).

Для полного анализа и правильной интерпретации полученных данных было необходимо изучить изменения концентрации глюкозы, лактата и пирувата в крови при развитии геморрагического шока.

После кровопотери концентрация глюкозы в крови значительно повышалась и достигала $113,3 \pm 7,2$ мг/100 мл при исходном уровне $68,8 \pm 4,6$ мг/100 мл. Выраженная гипергликемия удерживалась во все периоды геморрагического шока, повышаясь до $211,3 \pm 12,4$ мг/100 мл. После полного возмещения кровопотери концентрация глюкозы медленно снижалась и через 48 ч полностью не нормализовалась ($93,8 \pm 3,2$ мг/100 мл). Уровень пирувата в крови после кровопотери существенно повышался, достигая через 90 мин $3,32 \pm 0,37$ мг/100 мл при исходных данных $1,80 \pm 0,15$ мг/100 мл. На протяжении первых часов после гемотрансфузии концентрация пирувата оставалась высокой и лишь через 48 ч полностью нормализовалась. Аналогичным образом менялось количество лактата в крови. Его уровень значительно возрастал сразу после кровопотери, достигая максимума через 30 мин ($63,7 \pm 4,4$ мг/100 мл, при исходных данных $27,2 \pm 1,8$ мг/100 мл).

Взаимосвязь между концентрациями глюкозы, пирувата, лактата в крови и выживаемостью представлена на рис. 3. У всех животных концентрация лактата и пирувата удерживалась после гемотрансфузии на высоком уровне. У животных со смертельным исходом геморрагического шока была резко выраженная гипергликемия, у выживших собак концентрация глюкозы в крови лишь незначительно возрастала. Следовательно, только динамика уровня глюкозы в крови может быть прогностическим признаком исхода геморрагического шока.

На основании проведенных исследований можно сделать заключение, что массивная кровопотеря (50% общего ОЦК) приводит к существенным изменениям метаболизма печеночной ткани. При кровопотере и развитии геморрагического шока в печени резко угнетается гексокиназная активность, что является одной из причин возникновения гипергликемии. При массивной кровопотере усиливаются процессы гликогенолиза и трансаминирования. Выявлена прямая зависимость между изменениями кровяного давления и активности тканевых ферментов. Восполнение кровопотери в ранний период шока адекватным количеством крови улучшает тканевый метаболизм. Снижение уровня глюкозы в крови через час после гемотрансфузии является чувствительным показателем улучшения обменных процессов и благоприятным прогностическим признаком. Гемотрансфузии, проводимые в ранний период геморрагического шока, сохраняют жизнь животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гогложа Р. Л., Селезнев С. А. — «Бюлл. exper. биол.», 1965, № 4, с. 33. — 2. Селезнев С. А. Печень в динамике травматического шока. Л., 1971. — 3. Lefter A. M., Daw J. Ch., Berner R. M. — «Am. J. Physiol.», 1969, v. 216, p. 483. — 4. Weil M. H., Afifi A. A. — «Circulation», 1970, v. 41, p. 989. — 5. Ковач А. Д. — В кн.: Корреляция кровоснабжения с метаболизмом и функцией. Тбилиси, 1969, с. 217. — 6. Нейло Е. М. — «Бюлл. exper. биол.», 1967, № 4, с. 39. — 7. Lazarov V. P. — «C. R. Soc. Biol. (Paris)», 1969, v. 163, p. 1291. — 8. Stefanelli N., Pesch L., Pointner H. — «Z. ges. exp. Med.», 1970, Bd 152, S. 251. — 9. DePalma R. C., Levey S., Holden W. D. — «J. Trauma», 1970, v. 10, p. 122. — 10. Weaver D. Q., Henson E. C., Crowell J. W. et al. — «Arch. Path.», 1972, v. 93, p. 155. — 11. Петров И. П., Васадзе Г. М. Необратимые изменения при шоке и кровопотере. Л., 1966. — 12. Spitzer J. J., Spitzer J. A. — «Am. J. Physiol.», 1972, v. 222, p. 101. — 13. Гланц Р. М. Механизм действия перелитой крови. М., 1975. — 14. Гланц Р. М., Сковронская Е. В. — «Пробл. гематол.», 1975, № 1, с. 47. — 15. Сковронская Е. В. — В кн.: Гематология и пе-

реливание крови. Вып. 8. Киев, 1973, с. 129. — 16. Гогложа Р. Л. — «Лаб. дело», 1972, № 3, с. 164. — 17. Tulczyński M. — «Pol. Arch. Med. wewnet.», 1955, v. 25, p. 775. — 18. Barker J. B., Summerson W. H. — «J. biol. Chem.», 1941, v. 138, p. 535. — 19. Friedemann T. E., Hansen G. E. — «J. biol. Chem.», 1943, v. 147, p. 415. — 20. Somogyi M. — «J. biol. Chem.», 1945, v. 160, p. 69. — 21. Long C. — «Biochem. J.», 1952, v. 50, p. 407. — 22. Желудкова З. П. — «Ж. эволюц. биохим.», 1965, № 11, с. 193. — 23. Yatzidis H. — «Nature», 1960, v. 186, p. 79. — 24. Иванов И. И., Юрьев В. А. Биохимия и патофизиология мышц. Л., 1961. — 25. Ильин В. С. — «Ж. эволюц. биохим.», 1970, № 2, с. 148. — 26. Бельченко Д. И., Кукуй Л. М. — «Пат. физиол.», 1971, № 2, с. 98. — 27. Календо Г. С. — «Успехи совр. биол.», 1972, № 1, с. 59. — 28. Скворонская Е. В. — В кн.: Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии. М., 1974, с. 32.

Поступила 10/III 1977 г.

METABOLISM IN LIVER TISSUE UNDER CONDITIONS OF PROFUSE HEMORRHAGE AND IN ITS COMPENSATION

E. V. Skovronskaya

Experimental Department, Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Lvov

Content of lactate, pyruvate as well as activity of hexokinase, phosphorylases, ATPase and transaminases were studied in dog and rat liver tissues under conditions of acute profuse hemorrhage and after its complete compensation by autogenic, isogenic blood and by sodium chloride 0.9% solution. Distinct inhibition of the hexokinase activity in the hemorrhage led to impairment of glucose utilization in liver tissue and to development of hyperglycemia. Alterations in arterial blood pressure correlated with the activity of tissue enzymes. Tissue metabolism was improved after compensation of blood losses by adequate amounts of blood at early period of hemorrhagic shock.

УДК 616.15+616.41]-07:616.155.2-008.931:577.152.634

В. А. Егорова, З. Н. Беляева, М. Н. Блинов

АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛЦИКЛАЗЫ КРОВЯНЫХ ПЛАСТИНОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ НЕКОТОРЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СИСТЕМЫ КРОВИ

Ленинградский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Изучали активность фермента синтеза циклического аденозин-3,5-монофосфата в кровяных пластинках больных хроническим миелолейкозом, идиопатическим остеомиелофиброзом и тромбастенией Гланцмана. В кровяных пластинках больных хроническим миелолейкозом отмечено снижение активности аденилциклазы в 6 раз по сравнению с тромбоцитами доноров. При остеомиелофиброзе и тромбастении Гланцмана в кровяных пластинках активность этого фермента практически не отличается от нормы.

Циклический аденозин-3,5-монофосфат (цАМФ) является универсальным биологическим регулятором биохимических процессов в клетке, изменение концентрации которого оказывает влияние на многие процессы, в частности на регуляцию пролиферации и дифференциации клеток [1]. Внутриклеточное содержание цАМФ зависит от активности аденилциклазы — фермента аллостерического типа, превращающего АТФ в цАМФ. Аденилциклаза является посредником действия внешней среды на клетку. Гормоны и другие гуморальные факторы регуляции также реализуют свое влияние на клетку через мембранную систему аденилциклазы [2].

В регуляции функциональной активности кровяных пластинок цАМФ также принадлежит основная роль. Все этапы процесса гемостаза связаны с изменением внутриклеточной концентрации цАМФ в кровяных пластинках [3]. Однако в литературе полностью отсутствуют исследования, посвященные изучению метаболизма цАМФ в кровяных пластинках при заболеваниях системы крови, при которых наблюдается изменение многих биохимических показателей кровяных пластинок и их функциональной активности [4, 5].

Целью настоящей работы являлось изучение активности аденилциклазы в кровяных пластинках больных хроническим миелолейкозом, идиопатическим остеомиелофиброзом и тромбастенией Гланцмана.

Методика

Исследование проведено на кровяных пластинках, выделенных из крови доноров, больных хроническим миелолейкозом, идиопатическим остеомиелофиброзом и тромбастенией Гланцмана методом дифференциального центрифугирования [6]. Активность аденилциклазы определяли по методу [7]. В течение 30 мин инкубации гомогената степень образования цАМФ из ^{14}C -АТФ линейна во времени и пропорциональна количеству субстрата. Реакцию проводили в общем объеме 0,6 мл в среде следующего состава: $4 \cdot 10^{-2}$ М трис-буфер pH 7,4—0,06 мл, 10^{-2} М NaF — 0,06 мл, $3,3 \cdot 10^{-3}$ М MgSO_4 — 0,06 мл, 10^{-2} М теофиллин — 0,06 мл, $2 \cdot 10^{-3}$ М АТФ — 0,02 мл, ^{14}C -АТФ — 0,01 мл (0,05 мкКи (фирма «Amercham»), гомогенат кровяных пластинок — 200 мкг белка.

Реакцию останавливали кипячением инкубационной пробы на кипящей водяной бане. Радиоактивность проб определяли в газопотоочном счетчике типа «Протока». Зная число импульсов, внесенных в пробу в виде ^{14}C -АТФ, а также определив число импульсов в пробах за счет образовавшейся ^{14}C -цАМФ, рассчитывали количество образовавшегося цАМФ. Белок в гомогенате определяли по методу Лоури [8].

Результаты и обсуждение

В таблице представлены данные по определению активности аденилциклазы кровяных пластинок здоровых людей, больных хроническим миелолейкозом, остеомиелофиброзом и тромбастенией Гланцмана.

Проведенные исследования показали, что кровяные пластинки человека обладают довольно значительной активностью аденилциклазы. Активность аденилциклазы в кровяных пластинках здоровых людей равна $101,0 \pm 4,7$ нмоль цАМФ/мг белка за 30 мин.

В тромбоцитах больных хроническим миелолейкозом активность этого фермента резко снижена и равна $16,3 \pm 1,7$ нмоль цАМФ/мг белка за 30 мин. Можно полагать, что лейкозный процесс при хроническом миелолейкозе затрагивает не только клетки гранулоцитарного, но и мегакариоцитарного роста, поскольку, по современным представлениям, они имеют общую клетку-предшественницу. В этом случае снижение активности аденилциклазы, обнаруженное в наших исследованиях, хорошо согласуется с данными литературы [9, 10] об установлении общей зависимости для различных экспериментальных и спонтанных опухолей: внутриклеточное содержание цАМФ в них всегда меньше, чем в соответствующих нормальных клетках за счет снижения активности аденилциклазы, ответственной за синтез этого соединения.

При первичном миелофиброзе наиболее типичной является гиперплазия мегакариоцитарного роста, на который обращают внимание многие авто-

Активность аденилциклазы (в нмоль цАМФ на 1 мг белка за 30 мин) кровяных пластинок здоровых людей, больных хроническим миелолейкозом, остеомиелофиброзом и тромбастенией Гланцмана

Здоровые люди	Больные		
	хроническим миелолейкозом	остеомиелофиброзом	тромбастенией Гланцмана
83,3	26,6	93,6	226,0*
100,3	15,0	105,1	90,0
83,3	16,6	79,6	97,3
90,6	8,5	200,0*	116,6
117,8	16,5	250,0*	55,3
107,6	9,8	78,3	
98,8	19,6	61,3	
119,1	11,0	84,0	
97,1	19,1	90,6	
109,0	19,8	75,0	
99,6			
$101,0 \pm 4,7$	$16,3 \pm 1,7$	$84,2 \pm 2,5$	$87,0 \pm 1,3$
P	<0,001	>0,05	>0,05

* Больные с проявлениями кровоточивости.

ры [11, 12]. Мегакариоциты при этом заболевании значительно отличаются от нормальных аналогов полиморфизмом величины и форм, ШИК-отрицательной реакцией и другими морфологическими признаками нарушения тромбообразования.

Однако, как видно из таблицы, в кровяных пластинках больных этой группы активность аденилциклазы по сравнению с таковой в донорских тромбоцитах снижена незначительно и равна $84,2 \pm 2,5$ нмоль цАМФ/мг белка за 30 мин.

Незначительное снижение активности фермента, ответственного за уровень цАМФ, в кровяных пластинках больных остеомиелофиброзом по сравнению с кровяными пластинками больных хроническим миелолейкозом может говорить о различном пролиферативном состоянии мегакариоцитов при указанных заболеваниях системы крови.

Возможно, что остеомиелофиброз, как полагают некоторые исследователи [13, 14], не является заболеванием лейкемической природы, а связан с повреждением стромы костного мозга, поэтому является интересным сопоставление данных по активности аденилциклазы кровяных пластинок больных остеомиелофиброзом с активностью этого фермента тромбоцитов при другом заболевании системы крови пеллейкемической природы — тромбастении Гланцмана. При указанном заболевании активность аденилциклазы в кровяных пластинках, так же как и при остеомиелофиброзе, практически равна таковой донорских тромбоцитов (см. таблицу).

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что кровяные пластинки играют решающую роль в регуляции процесса свертывания крови [15]. На мембранах кровяных пластинок установлено наличие рецепторных молекул, посредством воздействия на которые изменяются физико-химические свойства мембран и их проницаемость. Согласно данным литературы [16], одним из компонентов клеточной мембраны кровяных пластинок является аденилциклаза. Имеются доказательства, что аденилциклаза кровяных пластинок человека является рецептором различных агрегирующих агентов. АДФ, адреналин, коллаген и тромбин индуцируют пластиночную агрегацию с одновременным угнетением пластиночной аденилциклазы [17].

Как видно из таблицы, у некоторых больных остеомиелофиброзом и тромбастенией Гланцмана активность аденилциклазы кровяных пластинок была повышена в несколько раз по сравнению с нормой. Интересно отметить, что у этих больных в период обследования наблюдались проявления геморрагического диатеза. Возможно, что увеличение активности аденилциклазы в кровяных пластинках больных с такими проявлениями является одной из причин, обуславливающих кровоточивость у этой группы больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федоров Н. А., Кострова А. А. — «Пробл., гематол.», 1975, № 9, с. 49—55. — 2. Sutherland E. W., Oye J., Bucher R. W. — «J. Am. chem. Soc.», 1965, v. 79, p. 3608—3614. — 3. Marcus A. J. — «New Engl. J. Med.», 1969, v. 280, p. 1213—1220. — 4. Inceman S., Tangun Y. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1972, v. 201, p. 251—262. — 5. Егорова В. А., Блинова А. И., Сейц И. Ф. — «Вопр. мед. химии», 1965, № 1, с. 35—40. — 6. Gurevitch I., Nelken D. — «Nature», 1954, v. 173, p. 356—357. — 7. Krishna G., Weiss B., Brodie B. — «J. Pharmacol. exp. Ther.», 1968, v. 163, p. 379—385. — 8. Lowry O. H. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265—268. — 9. Pastan I. — «Am. J. clin. Path.», 1975, v. 63, p. 669—670. — 10. Trautman O. D., Roth J. — «J. biol. Chem.», 1969, v. 244, p. 247—253. — 11. Dameshek W., Gunz F., Bailkil A. Leukemia. New York, 1976. — 12. Rohr K. — «Acta haemat. (Basel)», 1958, v. 20, p. 63—68. — 13. Немецкова Н. М., Протасова Т. Г. — «Тер. арх.», 1974, № 8, с. 9—14. — 14. Демидова А. В. — Там же, с. 19—28. — 15. Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И. Физико-химические механизмы и гормональная регуляция свертывания крови. М., 1974. — 16. Lieve P. D., Greenough W. B. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1969, v. 35, p. 462—466. — 17. Baenziger N., Brodie G. — «J. clin. Invest.», 1969, v. 50, p. 4a—5a.

Поступила 9/1 1977 г.

ACTIVITY OF ADENYL CYCLASE FROM PLATELETS IN SOME BLOOD SYSTEMIC IMPAIRMENTS

V. A. Egorova, Z. N. Belyaeva, M. N. Blinova

Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Leningrad

Adenyl cyclase activity was estimated in blood platelets of healthy persons and of patients with myeloleukosis, osteomyelofibrosis and with Glanzmann's thrombasthenia. Six-fold decrease in the adenyl cyclase activity from the platelets was observed in chronic myeloleukosis. The enzymatic activity in platelets was similar to normal level in osteomyelofibrosis and Glanzmann's thrombasthenia.

УДК 616-008.922.1.04-07:616.831-008.931:577.152.111'164

Е. М. Хватова, С. Н. Лавровский

ИЗОФЕРМЕНТЫ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КИСЛОРОДНОГО ГОЛОДАНИЯ

Кафедра биохимии Горьковского медицинского института

Приведены результаты сравнительного изучения активности и характеристика изоэнзимного спектра лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в ткани головного мозга животных при циркуляторной и гипоксической формах гипоксии. Показана четкая зависимость в повышении активности ЛДГ и анаэробизации спектра ее изоферментов от формы кислородной недостаточности, ее тяжести и продолжительности.

В изучении метаболических изменений, происходящих в тканях при кислородной недостаточности, получили распространение исследования активности и изоэнзимных форм лактатдегидрогеназы — ЛДГ (1-лактат : НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27). Накапливаются данные о том, что тетрамерные изоферменты ЛДГ, состоящие из двух типов субъединиц (Н и М), адекватно реагируют на изменения кислородного режима тканей [1, 2]. Выдвинута аэробно-анаэробная гипотеза, устанавливающая зависимость между напряжением кислорода в тканях и соотношением Н- и М-субъединиц ЛДГ [3]. Общепринята оценка аэробности или анаэробности обмена ткани по суммарной активности фракций ЛДГ_{1, 2} или ЛДГ_{4, 5}. Фракция ЛДГ₃, содержащая равное количество Н- и М-субъединиц, является промежуточной. Согласно этому, все ткани разделены на три основные группы с преобладанием аэробных фракций (ЛДГ_{1, 2}), анаэробных (ЛДГ_{4, 5}) и промежуточной (ЛДГ₃). Ткань головного мозга относится к первой группе и характеризуется некоторым преобладанием суммарной активности аэробных фракций ЛДГ_{1, 2} [4].

Известно, что кислородное голодание приводит к активации ЛДГ и анаэробизации спектра изоферментов в ткани головного мозга [5, 6]. Однако нет сведений о значении формы гипоксии мозга для динамики и степени изменений ЛДГ. В настоящей работе представлены результаты сравнительного исследования активности, изоферментного состава и соотношения субъединиц ЛДГ в мозге животных в условиях циркуляторной и гипоксической форм гипоксии.

Методика

Работа выполнена на белых крысах-самцах массой 150—200 г. Циркуляторную форму гипоксии головного мозга моделировали билатеральным лигированием общих сонных артерий. Исследования проводили через 30 мин, 1, 4 и 18 ч после перевязки артерий. Особенностью последней группы животных являлась неравнозначность тяжести состояния. У большинства животных общее состояние характеризовалось нарастанием тяжести, у меньшего числа крыс было зарегистрировано к этому сроку вполне удовлетворительное состояние. Гипоксическую гипоксию моделировали в барокамере проточного типа при «подъеме» на высоту 8000 м (атмосферное давление 260 мм рт. ст.) или на высоту 10 000 м (атмосферное давление 196 мм рт. ст.) с экспозицией 15 и 60 мин.

Т а б л и ц а 1

Активность и молекулярная характеристика ЛДГ мозга животных при циркуляторной гипоксии ($M \pm m$)

Группа животных	Общая активность, мкмоль НАД·Н на 1 мг белка в 1 мин	Изофермент, %					Соотношение субъединиц Н:М
		ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅	
Интактные $n=10$	$95,21 \pm 1,84$	$18,4 \pm 0,89$	$21,5 \pm 1,09$	$23,5 \pm 0,50$	$23,4 \pm 0,79$	$13,2 \pm 0,79$	$52,3:47,7$
Циркуляторная гипоксия:							
30 мин, $n=10$	$105,45 \pm 2,46$	$13,0 \pm 0,90$	$20,1 \pm 1,06$	$23,0 \pm 0,68$	$25,0 \pm 1,29$	$15,9 \pm 0,90$	$48,7:51,3$
P	$<0,02$	$>0,1$	$>0,5$	$>0,5$	$>0,1$	$<0,05$	
1 ч, $n=10$	$107,61 \pm 2,46$	$14,1 \pm 0,52$	$18,7 \pm 0,56$	$23,6 \pm 0,93$	$26,9 \pm 0,79$	$15,7 \pm 1,31$	$46,7:53,3$
P	$<0,01$	$<0,01$	$<0,02$	$>0,5$	$<0,02$	$<0,02$	
4 ч, $n=12$	$109,79 \pm 2,56$	$13,8 \pm 0,68$	$20,2 \pm 0,83$	$22,9 \pm 0,65$	$27,8 \pm 1,14$	$15,3 \pm 1,34$	$47,2:52,8$
P	$<0,01$	$<0,01$	$<0,05$	$>0,5$	$<0,01$	$<0,05$	
18 ч, $n=13$	$115,92 \pm 1,82$	$7,9 \pm 0,81$	$16,1 \pm 1,12$	$22,0 \pm 0,83$	$30,9 \pm 1,04$	$23,1 \pm 0,81$	$38,6:61,4$
P	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	$>0,5$	$<0,01$	$<0,01$	
18 ч (удовлетворительная), $n=16$	$97,78 \pm 1,29$	$13,8 \pm 0,88$	$20,0 \pm 0,76$	$26,4 \pm 0,62$	$29,2 \pm 1,12$	$10,6 \pm 0,81$	$50,3:49,7$
P	$>0,5$	$<0,01$	$>0,5$	$>0,2$	$<0,01$	$<0,02$	

Общую активность ЛДГ определяли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-4А [7]. Разделение изоферментов ЛДГ производили методом электрофореза в полиакриламидном геле [8]. Количественную оценку активности изоферментов проводили денситометрически на приборе ЕРІ 65m (ГДР). Рассчитывали соотношение субъединиц Н:М [9]. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

В ткани головного мозга интактных животных выявлено 5 изоферментов ЛДГ при некотором преобладании суммарной удельной активности аэробных ЛДГ_{1,2} над активностью анаэробных ЛДГ_{4,5} (табл. 1). В субъединичном составе имеет место некоторое преобладание Н-субъединиц (52,3%). Полученные результаты о изоэнзимном составе ЛДГ мозга интактных животных вполне согласуются с имеющимися в литературе [10, 11].

При циркуляторной гипоксии уже в ближайший из исследованных сроков определялся первичный прирост общей активности ЛДГ ткани мозга, которая продолжала нарастать в течение всего последующего периода (см. табл. 1). В изоэнзимном спектре ЛДГ выявлен ранний прирост удельной активности анаэробных изоферментов ЛДГ_{4,5} при одновременном снижении аэробных ЛДГ_{1,2}. Анаэробизация спектра ЛДГ устойчиво прогрессировала в течение 18 ч. Соотношение субъединиц в тетраметрах ЛДГ при частичной ишемизации ткани мозга изменялось в сторону увеличения содержания М-субъединиц. Удельная активность изофермента ЛДГ₃ оставалась неизменной во все сроки исследования (см. табл. 1).

Максимальная активность ЛДГ (на 23% выше, чем у интактных животных) и наиболее выраженное перераспределение в составе ее изоэнзимов, составившее 1,5-кратное увеличение суммарной активности анаэробных ЛДГ_{4,5}, ус-

таювлены при тяжелой форме 18-часовой ишемии головного мозга. В то же время активность ЛДГ и состав ее изоферментного спектра в группе животных, состояние которых к этому времени было удовлетворительным, практически не отличались от уровня у интактных животных.

При гипоксической гипоксии в отличие от циркуляторной отмечена иная динамика общей активности и изоэнзимных перестроек в спектре ЛДГ. При высоте 8000 м уже через 15 мин экспозиции определяли повышение общей активности ЛДГ (на 18%) и активацию анаэробных фракций ЛДГ_{4,5} (в 1,2 раза). Однако удлинение срока пребывания животных на высоте 8000 м (до 60 мин) приводило лишь к незначительному приросту активности ЛДГ, а нарастания изменений в ее изоэнзимном спектре практически не происходило (табл. 2). Наибольший прирост общей активности ЛДГ (на 20% выше, чем у интактных животных) и увеличение суммарной активности анаэробных ЛДГ_{4,5} (в 1,3 раза) отмечены после экспозиции животных на высоте 10 000 м. В субъединичном составе ЛДГ при гипоксической гипоксии также происходило увеличение содержания анаэробных М-субъединиц и снижение Н-субъединиц, но эти изменения происходили в меньшей степени, чем при циркуляторной форме кислородной недостаточности.

Не вызывает сомнения, что в основе механизма повышения общей активности ЛДГ в мозге при кислородном голодании лежит усиление гликолитического пути обмена углеводов [12]. Повышенное содержание накапливающейся молочной кислоты в свою очередь вызывает активацию изоферментов ЛДГ_{4,5} и одновременное ингибирование ЛДГ_{1,2} в силу различия их кинетических свойств [13].

Выявленные особенности в динамике изменения общей активности ЛДГ, а также в быстроте и устойчивости анаэробизации ее изоферментов четко коррелируют с характером изменения содержания молочной кислоты в подобных условиях гипоксии. В свою очередь содержание молочной кислоты в ткани мозга и динамика ее накопления имеют характерную зависимость от формы кислородно-дефицитного состояния [14]. Так, пролонгирование циркуляторной ги-

Т а б л и ц а 2

Общая активность и множественные молекулярные формы ЛДГ мозга животных при гипоксической гипоксии ($M \pm m$)

Группа животных	Общая активность, мкмоль НАД·Н на 1 мг белка в 1 мин	Изофермент, %				Соотношение субъединиц Н:М	
		ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄		ЛДГ ₅
Интактные (n=12)	95,21±1,84	18,4±0,89	21,5±1,09	23,5±0,50	23,4±0,79	13,2±0,93	52,3:47,7
Гипоксическая гипоксия:							
8000 м, экспозиция 15 мин, n=10	106,56±1,95	12,3±1,13	19,7±1,13	23,4±0,53	26,1±1,13	18,3±0,94	45,2:54,8
<i>P</i>	<0,01	<0,01	>0,05	>0,5	>0,05	<0,01	
8000 м, экспозиция 60 мин, n=12	108,44±2,83	11,7±0,84	17,7±1,0	23,6±0,39	30,1±1,41	17,0±0,78	44,2:55,8
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,02	>0,5	<0,05	<0,01	
10 000 м, экспозиция 60 мин, n=10	114,98±1,14	9,8±0,78	18,2±0,72	23,9±0,62	31,0±0,66	17,1±0,59	43,0:57,0
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,01	>0,5	<0,01	<0,01	

поксии сопровождалось постепенным накоплением молочной кислоты. Соответственно этому выявлена нарастающая активация ЛДГ и анаэробизация спектра ее изоферментов за счет увеличения содержания в тетрамерах ЛДГ анаэробных М-субъединиц. Корреляционный анализ установил прочную положительную коррелятивную связь между содержанием молочной кислоты и активностью ЛДГ ($r = +0,92 \pm 0,063$).

В то же время при гипоксической гипоксии первичный прирост лактата поддерживался в течение некоторого времени на постоянном уровне. В соответствии с этим первичная активация ЛДГ и анаэробизация изоэнзимного спектра за счет увеличения содержания анаэробных М-субъединиц также поддерживались в течение некоторого времени на постоянном уровне. Степень этих изменений зависела лишь от тяжести гипоксического воздействия. В этих условиях также установлена прочная положительная коррелятивная связь между содержанием молочной кислоты и активностью ЛДГ ($r = +0,93 \pm 0,072$). Таким образом, форма гипоксии определила особенность динамики содержания молочной кислоты в ткани мозга и соответственно прирост активности ЛДГ, а также степень выраженности изменений в спектре ее изоферментов.

Несомненный интерес представляют результаты, полученные при 18-часовой циркуляторной гипоксии, свидетельствующие о различной реакции ЛДГ и ее множественных молекулярных форм в ответ на длительное гипоксическое воздействие. Сравнивая две группы животных 18-часовой циркуляторной гипоксии, кажется возможным предположить, что в основе различия лежат индивидуальные особенности системы кровообращения головного мозга. В большинстве случаев удлинение гипоксического воздействия приводило к развитию глубоких нарушений метаболизма нервной ткани, что нашло отражение, в частности, в результатах, полученных при исследовании ЛДГ. Однако в ряде случаев компенсаторные возможности мозгового кровообращения явились достаточными для того, чтобы не вызвать существенной перестройки обмена веществ и произвести временную компенсацию метаболических нарушений [15]. Подтверждением последнего может быть тот факт, что активность ЛДГ и ее изоэнзимный спектр, а также общее состояние животных сохранялись на уровне, близком к таковому у интактных животных.

Обращает на себя внимание постоянная во все исследованные сроки активность ЛДГ₃. Эта молекулярная форма ЛДГ в силу особенностей своего строения мало подвержена регулирующему действию молочной кислоты и не меняет свою активность в условиях гипоксии.

Анализ субъединичного строения изоферментов ЛДГ мозга при циркуляторной и гипоксической гипоксии позволил выявить в динамике кислородно-дефицитного состояния увеличение содержания анаэробных М-субъединиц и одновременное снижение Н-субъединиц. Однако степень субъединичной перестройки также определялась формой гипоксического воздействия. Можно полагать, что в основе изменения субъединичного состава изоферментов ЛДГ при гипоксии лежат молекулярные преобразования тетрамеров ЛДГ по типу диссоциации и рекомбинации с избирательным ингибированием или разрушением Н-мономеров [16].

Таким образом, полученные результаты четко свидетельствуют о том, что изменение активности ЛДГ и перестройка изоферментного спектра в ткани мозга имеют свои особенности при циркуляторной и гипоксической гипоксии. Динамика и степень выраженности возникающих изменений общей активности ЛДГ коррелируют с содержанием молочной кислоты в ткани мозга. Активация ЛДГ сопряжена с анаэробизацией спектра ее изоферментов, в основе которой лежит молекулярное преобразование тетрамеров фермента с изменением соотношения Н- и М-субъединиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поступаев В. В., Ананьева Г. В., Литонян З. М. — «Вопр. мед. химии», 1976, № 1, с. 59. — 2. Hellung-Larsen P., Yensen M. A., Sørensen S. C. — «Acta physiol. scand.», 1973, v. 87, p. 15. — 3. Дание-

лян К. С. — «Биол. ж. Армении», 1974, № 10, с. 17. — 4. Юрков Ю. А. — В кн.: Проблемы медицинской химии. М., 1973, с. 39. — 5. Брумберг В. А. — «Докл. АН СССР», 1973, т. 211, с. 470. — 6. Айтматов М. К. — «Сборник научн. трудов Киргизск. мед. ин-та», 1973, т. 84, с. 7. — 7. Wroblewski F., La Due J. S. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)», 1955, v. 193, p. 210. — 8. Dietz A. A., Lubra-по Т. — «Analyt. Biochem.», 1967, v. 20, p. 246. — 9. Hellung-Larsen P., Andersen A. — «Exp. Cell Res.», 1968, v. 50, p. 286. — 10. Мовсесян С. Г., Мовсесян Н. О. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Т. 10. Ереван, 1975, с. 75. — 11. Амадян М. Г. — «Вопр. мед. химии», 1976, № 2, с. 161. — 12. Симанов-ский Л. Н., Лифшиц Н. М. — Там же, 1969, № 1, с. 66. — 13. Уилкин-сон Д. Изоферменты. М., 1968, с. 83. — 14. Мартынов Н. В. — В кн.: Клеточное дыхание в норме и в условиях гипоксии. Горький, 1973, с. 51. — 15. Барамидзе Д. Г., Мchedlishvili С. И. — В кн.: Компенсаторные приспособления при патологии сердечно-сосудистой системы. Минск, 1966, с. 190. — 16. Markert C. — «Science», 1963, v. 140, p. 83.

Поступила 14/1. 1977 г.

LACTATE DEHYDROGENASE ISOZYMES FROM BRAIN IN VARIOUS CONDITIONS OF OXYGEN DEFICIENCY

E. M. Khvatova, S. N. Lavrovsky

Chair of Biochemistry, Medical School, Gorki

Spectrum of LDH isozymes and their activity were compared in animal brain tissue under circulatory and hypoxic forms of hypoxia. Dynamics and manifestation of alterations observed correlated primarily with the type of oxygen deficiency as well as with its severity and length of action. Development of oxygen deficiency in brain tissue was accompanied by increase in total LDH activity and by elevation in content of M-subunits, typical for «anaerobic» spectrum of LDH isozymes, with simultaneous decrease in amount of H-subunits.

УДК 616.981.25-092.9-07:616-008.931-074

К. П. Кашкин, Н. А. Никифорова

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ИЗОФЕРМЕНТОВ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ, ПОЧЕК И СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Институт усовершенствования врачей им. С. М. Кирова, Ленинград

Изучено изменение активности и спектра множественных форм некоторых ферментов в сыворотке крови и клетках миокарда и почек крыс в динамике стафилококковой инфекции и после введения им экзо- и эндоклеточного белка стафилококков. При стафилококковой инфекции у животных выявлено нарушение нормального внутриклеточного распределения ферментов в исследуемых органах и накопление в крови тканевых изоформ ферментов. Установлено дифференцированное влияние экзо- и эндоклеточных веществ стафилококков на спектр и активность изоферментов почек, миокарда и сыворотки крови крыс.

В патогенезе стафилококковой инфекции, как известно, существенную роль играют токсины и ферменты возбудителя [1, 5—8]. Однако механизмы их повреждающего действия на клетки разных органов и возникающие при этом биохимические изменения изучены совершенно недостаточно. В данной работе представлены результаты исследования у животных при стафилококковой инфекции некоторых изоферментов крови, сердечной мышцы и почек, а также изменения в спектре и активности изоферментов при введении животным продуктов жизнедеятельности или эндоклеточных веществ стафилококков.

Методика

Работу выполняли на половозрелых крысах-самцах Вистар. Для моделирования стафилококковой инфекции животным внутривенно (v. dorsalis penis) вводили взвесь клеток высоко- или умеренновирulentной культуры золотистого стафилококка из расчета 500 млн. клеток на 100 г массы животного. На 3, 7, 14 и 21-й дни после заражения животных забивали и исследовали характер поражения внутренних органов (срезы окра-

шивали гематоксилин-эозином). В эти же сроки в крови и гиалоплазме клеток сердечной мышцы и почек исследовали активность и спектр изоферментов лактатдегидрогеназы — ЛДГ (КФ 1.1.1.27), аспартат-аминотрансферазы — ААТ (КФ 2.6.1.1), кислой — КФ (КФ 3.1.3.2) и щелочной — ЩФ (КФ 3.1.3.1) фосфатазы и эстераз эфиров карбоновых кислот. Для выделения гиалоплазмы ткань сердечной мышцы или почек гомогенизировали на холоду в поттеровском гомогенизаторе с равным объемом (отношение веса к объему равно 1 : 1) 0,035 М трис-НСl-буфера рН 7,4 и центрифугировали при 105 000 g в течение 90 мин. В некоторых экспериментах для извлечения гранулярных ферментов ткань гомогенизировали в равном объеме 1% дезоксихолата натрия (ДОХ-экстракт). Супернатант (гиалоплазма клеток или ДОХ-экстракт) после определения в нем содержания белка подвергали электрофоретическому разделению в 1% агарово-крахмальном геле в течение 70 мин при градиенте напряжения 7,3 В/см². Активность изоферментов в электрофореграммах выявляли при инкубации электрофореграмм в хромогенных субстратах [4]. Окрашенные электрофореграммы фиксировали в уксусной кислоте, подсушивали и денситометрировали на регистрирующем денситометре Egi-65 (фирма «Zeiss-Jena»). Активность изоферментов выражали в условных единицах, пропорциональных оптической плотности изоформ на шкале денситометра. В каждый из сроков забивали и параллельно обследовали по 3 крысы и полученные результаты подвергали статистической обработке с определением средней арифметической и стандартной ошибки. Для выяснения некоторых сторон патогенеза стафилококковой инфекции животным вводили высокомолекулярные экзоклеточные продукты жизнедеятельности стафилококков, выращиваемых на синтетической питательной среде (среда № 199, содержащая 1% глюкозы), или эндоклеточный материал возбудителя, полученный при ультразвуковой дезинтеграции клеток стафилококка и удалении клеточных стенок и гранул микробов препаративным центрифугированием в течение 60 мин при 105 000 g. Экзо- и эндоклеточный материал стафилококков вводили крысам внутривенно из расчета 4 мг белка на 100 г массы животного.

Результаты и обсуждение

У подопытных крыс дистрофические и воспалительные изменения в сердечной мышце и почках отмечались уже на 3-и сутки после заражения. К 7-м суткам в процесс вовлекались легкие, в которых выявлялась сливная пневмония с очаговым некрозом. Морфологические изменения были наиболее выраженными к 14-м суткам и в сердце характеризовались дистрофическими изменениями миокарда, а в почках — обширными очагами некроза как в корковом, так и в мозговом веществе. Спектр изоферментов ЛДГ, ААТ, КФ, ЩФ и эстераз сыворотки крови, а также клеток миокарда и почек интактных крыс не отличался от такового, ранее описанного у крыс других линий [2, 3] (рис. 1).

Развитие у животных инфекционного процесса приводило к уменьшению на 3-и и 7-е сутки после заражения активности сывороточных эстераз и увеличению активности ЛДГ. Изменение активности сывороточных ЛДГ сопровождалось резким увеличением в крови активности электрофоретически «быстрых» (ЛДГ₁ и ЛДГ₂) изоформ фермента и уменьшением «медленных» (ЛДГ₄ и ЛДГ₅) фракций. Лишь на 14-е сутки активность «медленных» фракций ЛДГ повышалась, однако все еще не достигала уровня активности этих изоферментов в крови у интактных крыс.

На протяжении 1-й недели после заражения снижение у крыс активности эстераз было связано с уменьшением содержания электрофоретически «быстрых» изоформ эстераз (Э₁, Э₂), являющихся ацетил-эстеразами. Во все сроки наблюдения за подопытными животными отмечено увеличение у них в крови активности КФ, достигающее максимума на 3-и и 7-е сутки после заражения их. Отклонения в спектре ЛДГ и эстераз сыворотки крови были аналогичными у животных, зараженных как высоко-, так и умеренновирulentной культурой стафилококка (см. рис. 1, В).

Активность ЛДГ в гиалоплазме клеток сердца инфицированных животных изменялась фазово, а некоторое снижение активности ЛДГ на 3-и и 7-е сутки сменялось повышением активности на 14-е и 21-е сутки. Снижение суммарной активности ЛДГ в гиалоплазме клеток сердца было связано с уменьшением активности ЛДГ₁, уровень которой в крови в это же время возрастал. Существенно, что содержание ЛДГ₁ в цитоплазматических гранулах сердечной мышцы крыс вплоть до 21-х суток после заражения было выше, чем у интактных животных.

Активность ЛДГ₂ в гиалоплазме и ДОХ-экстрактах миокарда на протяжении первых 7 сут существенно не изменялась, но на фоне снижения содержания ЛДГ₁ эта изоформа ЛДГ доминировала среди других изоформ ЛДГ сердца, особенно возрастая в гиалоплазме клеток сердечной мышцы животных на 14-е и 21-е сутки после заражения. При заражении крыс менее вирулентной культурой стафилококка увеличение активности ЛДГ₂ было более выраженным. На 14-е и 21-е сутки увеличение в крови подопытных крыс ЛДГ₄ и ЛДГ₅ коррелировало с возросшим содержанием этих фракций фермента как в гиалоплазме,

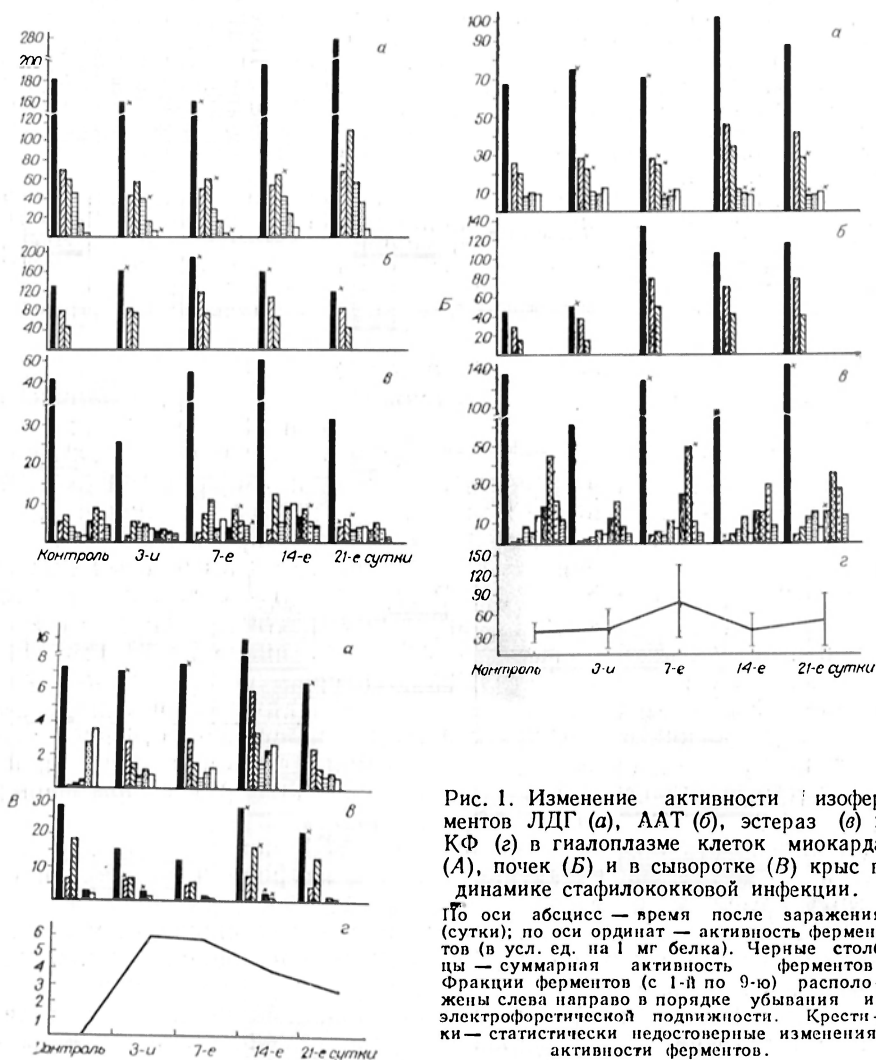
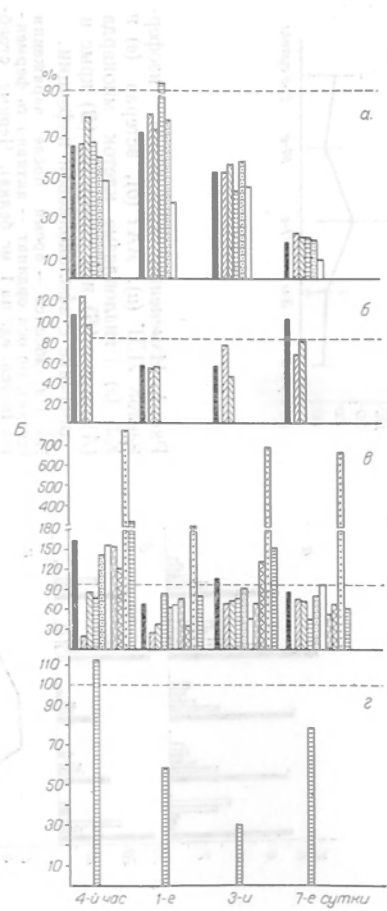
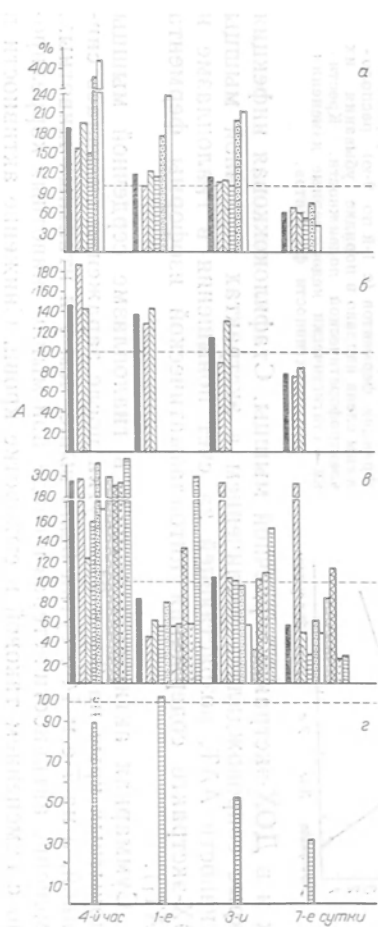


Рис. 1. Изменение активности изоферментов ЛДГ (а), ААТ (б), эстераз (в) в гиалоплазме клеток миокарда (А), почек (Б) и в сыворотке (В) крыс в динамике стафилококковой инфекции.

По оси абсцисс — время после заражения (сутки); по оси ординат — активность ферментов (в усл. ед. на 1 мг белка). Черные столбцы — суммарная активность ферментов. Фракции ферментов (с 1-й по 9-ю) расположены слева направо в порядке убывания их электрофоретической подвижности. Крестики — статистически недостоверные изменения активности ферментов.

так и в ДОХ-экстракте сердечной мышцы. Стафилококковая инфекция у крыс сопровождалась увеличением в экстрактах сердечной мышцы активности ААТ, возрастающей за счет повышения в гиалоплазме и ДОХ-экстракте содержания цитоплазматической изоформы фермента (ААТ₁).

Суммарная активность эстераз в гиалоплазме сердечной мышцы подопытных крыс на 3-и и 21-е сутки после заражения оказалась сниженной, а на 7-е и 14-е сутки была выше, чем у и нтактных животных. Изменение активности эстераз в сердечной мышце животных коррелировало с изменением таковой в сыворотке крови. Снижение активности в гиалоплазме сердца было связано с уменьшением как цитоплазматических, так и гранулярных изоформ эстераз, тогда как повышение



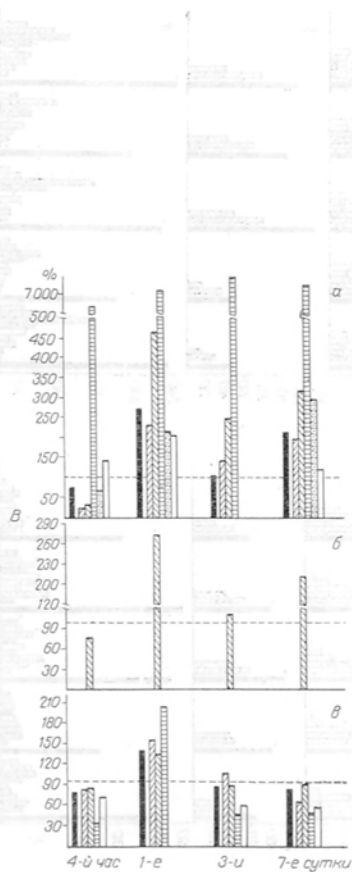


Рис. 2. Изменение активности изоферментов ЛДГ (*a*), ААТ (*б*), эстераз (*в*) и КФ (*г*) в гиалоплазме клеток миокарда (*A*), почек (*B*) и в сыворотке крыс (*B*) после введения им экзоклеточного белка стафилококков.

По оси абсцисс — время после введения белка (часы, сутки); по оси ординат — активность (в % по отношению к контролю). Пунктирная линия — уровень активности ферментов у контрольных животных (100%). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

активности эстераз в гиалоплазме (7- и 14-е сутки) происходило на фоне внутриклеточного распределения эстераз и уменьшения их активности в цитоплазматических гранулах клеток миокарда (см. рис. 1, А).

Развитие инфекционного процесса сопровождалось повышением активности ЛДГ в гиалоплазме и ДОХ-экстракте почек крыс с максимумом, приходящимся на 14-е сутки после заражения животных. Повышение активности ЛДГ в эти сроки характеризовалось увеличением в гиалоплазме и ДОХ-экстракте клеток почек ЛДГ₁ и ЛДГ₂, а в ДОХ-экстракте — еще и ЛДГ₄ и ЛДГ₅. В ДОХ-экстракте почек подопытных крыс активность ЛДГ₂ оказывалась повышенной во все сроки наблюдения за животными, за исключением 7-х суток.

Активность ААТ в клетках почек возрастала на 7-е сутки после заражения в 2¹/₂—3 раза и сохранялась на этом уровне вплоть до 21-х суток после заражения. Повышение активности ААТ не сопровождалось изменением относительного содержания в почках цитоплазматической и митохондриальной изоформ фермента.

Активность КФ в экстрактах клеток почек подопытных крыс оказывалась повышенной во все сроки наблюдения за животными, но максимальных значений достигала на 14-е сутки после заражения крыс.

Активность эстераз в гиалоплазме клеток почек оказалась сниженной на 3-и и 14-е сутки после заражения и достоверно не отличалась от таковой у интактных животных на 7-е и 21-е сутки. Как и при исследовании активности эстераз в сердечной мышце, снижение активности ферментов в гиалоплазме клеток почек крыс было связано с уменьшением активности в гранулярных фракциях эстераз. Восстановление спектра эстераз в гиалоплазме сопровождалось относительным снижением активности эстераз в цитоплазматических гранулах клеток (см. рис. 1, Б).

Для выяснения значения экзоклеточных токсинов стафилококка и эндоклеточных веществ возбудителя в возникновении отмеченных при стафилококковой инфекции изменений в спектре и активности тканевых изоферментов те же показатели были исследованы у крыс, которым внутривенно вводили накапливающиеся в питательной среде экзоклеточные продукты жизнедеятельности микроба или водорастворимый материал клеток микроба.

Введение экзотоксинов стафилококка уже через 4 ч вызывало снижение в крови активности ЛДГ (за счет электрофоретически «быстрых» фракций ЛДГ₁ и ЛДГ₂) и эстераз и повышение в крови активности КФ и ААТ. Содержание в крови ААТ и КФ возрастало вплоть до 7-х суток наблюдения за животными. Активность ЛДГ в сыворотке крови изменялась фазово, и периоды повышения суммарной активности (1-е и 7-е сутки) сменялись периодами ее снижения (3-и сутки). Повышение активности ЛДГ было связано с увеличением в крови содержания как электрофоретически «быстрых» (ЛДГ₁ и ЛДГ₂), так и электрофоретически «медленных» (ЛДГ₄ и ЛДГ₅) изоформ. Повышение в крови подопытных животных активности ЛДГ₄ и ЛДГ₅, по-видимому печеночного происхождения, свидетельствует о вовлечении в патологический процесс печени. Активность эстераз в крови животных этой группы существенно возрастала только в 1-е сутки после введения экзотоксинов, а в остальные сроки обследования достоверно не отличалась от таковой у интактных крыс.

Спектр ЛДГ в сердечной мышце крыс после введения стафилококковых экзотоксинов существенно не изменялся, а суммарная активность ЛДГ через 4 ч после введения токсинов на фоне снижения активности ЛДГ в крови резко возрастала. Активность ЛДГ в почках этих животных последовательно снижалась в связи с уменьшением в них активности как электрофоретически «быстрых», так и «медленных» изоформ ЛДГ (рис. 2, А, а, Б, а).

Спектр и суммарная активность ААТ в клетках сердца крыс под влиянием микробных токсинов существенно не изменялись, а в почках актив-

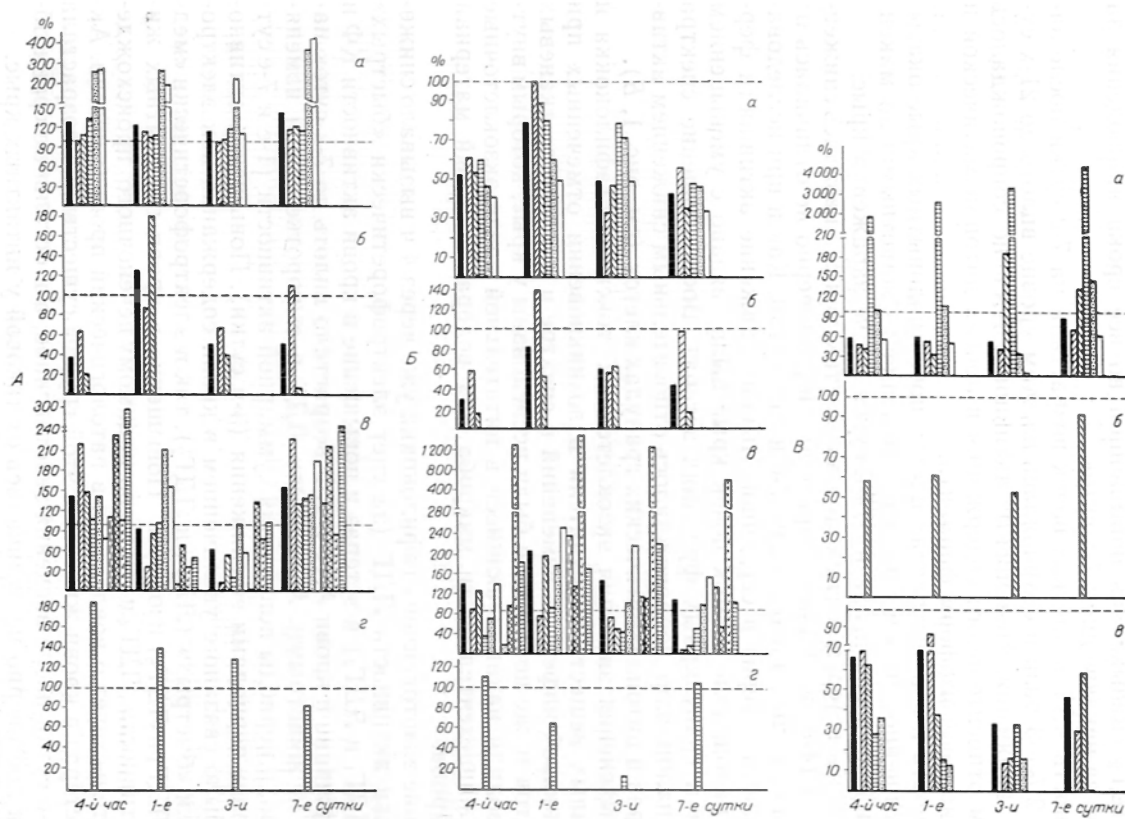


Рис. 3. Изменение активности изоферментов ЛДГ (а), ААТ (б), эстераз (в) и КФ (г) в гиалоплазме клеток миокарда (А), почек (Б) и в сыворотке крыс (В) после введения им эндоклеточного белка стафилококков.

Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

ность снижалась и лишь к 7-м суткам восстанавливалась, приближаясь к уровню активности этого фермента в клетках почек интактных крыс (рис. 2, А, б, Б, б).

Активность КФ в сердце подопытных крыс практически не изменялась, а в почках коррелировала с изменением активности КФ в сыворотке крови, так что снижение активности фермента в почках и сыворотке по времени совпадало (рис. 2, А, г, Б, г).

Введение крысам внутриклеточных веществ стафилококка не сопровождалось увеличением в крови активности ЛДГ или изменением спектра изоферментов ЛДГ, но приводило к значительному накоплению (по сравнению с экспериментами с введением экзоклеточных веществ) в крови изоферментов КФ и ЩФ, активность которых в крови достигала максимума на 3-и сутки (рис. 3). Введение подопытным крысам эндоклеточных веществ стафилококков вызывало у них относительное увеличение в сердечной мышце ЛДГ₄ и суммарной активности ЛДГ в почках (-е сутки после введения), быстрое увеличение (через 4 ч), снижение (3-и сутки) и нормализацию (7-е сутки) активности КФ в почках и сердце. Спектр и относительное содержание отдельных изоформ КФ и ААТ у подопытных и интактных животных при этом существенно не различались (см. рис. 3, А, Б).

Введение крысам стафилококковых экзотоксинов и эндоклеточных веществ сопровождалось быстрым (через 4 ч) увеличением активности эстераз как в гиалоплазме, так и в ДОХ-экстракте сердечной мышцы крыс. В дальнейшем в случае введения экзотоксинов активность эстераз в клетках исследуемого органа или была пониженной (1-е и 7-е сутки), или возрастала за счет относительного увеличения активности эстераз в цитоплазматических гранулах клеток (3-и сутки). Возрастание активности эстераз в ДОХ-экстрактах сердечной мышцы было связано не с увеличением таковой в гранулярных фракциях, а с накоплением в цитоплазматических гранулах изоформ эстераз, которые у интактных животных преимущественно содержались в гиалоплазме клеток (Э₂) (рис. 2, А, в).

При введении животным эндоклеточных веществ стафилококка спектр эстераз гиалоплазмы и ДОХ-экстракта почек крыс значительно не изменялся, тогда как суммарная активность эстераз во все сроки обследования была выше, чем у интактных животных (см. рис. 3, Б, в). Активность эстераз в клетках почек после введения животным стафилококковых экзотоксинов увеличивалась через 4 ч и несколько снижалась через 1 и 7 сут после инъекции, хотя относительное содержание различных изоформ эстераз в гиалоплазме и ДОХ-экстракте клеток почек при этом не изменялось (рис. 2, Б, в).

Как показали проведенные эксперименты, генерализованная стафилококковая инфекция сопровождается значительными изменениями в метаболизме клеток сердца и почек животных. Показателем повреждения этих органов является накопление в крови животных тканевых изоформ ферментов и выраженное нарушение нормального внутриклеточного распределения изоферментов между цитоплазматическими гранулами и гиалоплазмой клеток органов. Повреждения клеток сердечной мышцы проявляются раньше и сохраняются на протяжении всего периода наблюдения за животными (3 нед): изменения активности и спектра изоферментов в клетках почек развиваются медленнее и достигают максимума на 14-е сутки после заражения животных. Нарушение в сердечной мышце энергетических процессов и повышение проницаемости наружных и интрацеллюлярных клеточных мембран возникают под влиянием экзоклеточных веществ возбудителя (стафилококковые экзотоксины). Эндоклеточный материал возбудителя вызывает повышение в крови и органах животных активности лизосомальных ферментов, а также изменение наружных клеточных мембран и в результате этого увеличение в крови содержания КФ, ЩФ и некоторых изоформ эстераз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выгодчиков Г. В. Стафилококковые инфекции. М., 1963. — 2. Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию. Л., 1974. — 3. Кашкин К. П. Иммунохимическое исследование жидкостей и тканей организма в норме и при лучевых поражениях. Дис. докт. Обнинск, 1969. — 4. Суринов Б. П., Кашкин К. П., Бочкова Д. Н. и др. — «Лаб. дело», 1970, № 4, с. 240. — 5. Чистович Г. Н. Патогенез стафилококковой инфекции. Л., 1961. — 6. Denys J., Van de Velde H. — «Cellule», 1895, v. 11, p. 359. — 7. Walbum L. — «Biochem. Z.», 1922, Bd 129, S. 367. — 8. Wiseman G., Caird J. — «Canad. J. Microbiol.», 1972, v. 18, p. 987.

Поступила 5/VII 1976 г.

ACTIVITY OF SOME ISOENZYMES FROM HEART, KIDNEY AND BLOOD SERUM IN EXPERIMENTAL STAPHYLOCOCCAL INFECTION

K. P. Kashkin, N. A. Nikiforova

S. M. Kirov Institute for Post-Graduate Training of Physicians, Leningrad

Alteration in activity and spectrum of multiple forms of some enzymes were studied in rat blood serum, myocardium and kidney cells in dynamics of staphylococcal infection as well as after administration of exo- and intracellular protein of staphylococci into animals. In the infection intracellular distribution of enzymes was impaired in animal tissues studied and «tissue» isoforms of enzymes were accumulated in blood. Staphylococcal exo- and intracellular substances were found to effect dissimilarly on spectrum and activity of isoenzymes from rat kidney, myocardium and blood serum.

УДК 615.835.3.015.45:612.822.1

А. А. Кричевская, В. С. Шугалей, Е. З. Цветненко, А. А. Ананян

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ АРГИНИНА ПРИ ГИПЕРОКСИИ. АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМИНАЗЫ И ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ МОЗГА

Кафедра биохимии Ростовского-на-Дону университета

Активность фосфатзависимой и фосфатнезависимой глутаминазы в больших полушариях мозга крыс снижается при гипероксии (6 атм) на 45 и 51% соответственно. Активность глутаматдекарбоксилазы в этих условиях снижается на 32%. Аргинин дает защитный эффект, отдаляя время наступления кислородных судорог в 2¹/₂ раза. Активность глутаминазы при этом остается пониженной, активность глутаматдекарбоксилазы повышается и превышает контрольный уровень на 29%.

В последние годы кислород под давлением все шире применяется в медицине, акванавтике и других сферах практической деятельности [1, 2]. Вовлечение людей в контакт с гипероксией ставит задачу поиска надежных средств химической защиты от кислородной интоксикации. В нашей лаборатории предложены в качестве защитных веществ природные метаболиты: аргинин, мочевины, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) и их смеси [3—5]. Предварительное введение этих соединений перед сеансом гипероксии отодвигает наступление кислородных судорог, предотвращает гибель животных после перенесенной гипероксии. Аргинин проявляет защитное действие не только при гипероксии, но и при гипотермии [6], отравлении солями аммония [7], поражениях печени [8].

Для выяснения механизма защитного действия аргинина при гипероксии мы использовали метаболиты, содержание которых изменяется в ранние сроки кислородной интоксикации, и ферменты их превращения. Так, содержание аммиака в мозге увеличивается при действии повышенного давления кислорода [3, 4]. Возможным источником аммиака в мозге является дезамидирование глутамина, осуществляемое глутаминазами. Судя по коэффициентам седиментации и молекулярной массе, глутаминаза в мозге существует по крайней мере в трех формах: трис-НСI-фермент, фос-

фатактивируемая глутаминаза и фермент, активируемый фосфатом и боратом [9]. Катапума и соавт. считают, что в мозге существуют две изоформы глутаминазы — фосфатзависимая (ФЗГ) и фосфатнезависимая (ФНГ). Последняя активируется карбонатом или малеатом. Изоформы отличаются друг от друга оптимумом pH и термостабильностью [10]. В почках ФНГ оказалась идентичной γ -глутамилпептидазе [11]. ФНГ из мозга пока не очищена; глутаминаза, активируемая фосфатом, выделена из мозга в гомогенном состоянии [12].

Глутаминовая кислота в специфической для мозга реакции декарбоксилирования образует ГАМК. Активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК) и содержание ГАМК в ткани мозга могут служить одним из тонких показателей глубины кислородного отравления [13].

В настоящей работе определяли активность ФЗГ и ФНГ, а также ГДК в мозге при гипероксии 6 ати и защитном действии аргинина.

Методика

Постановка опыта. Опыты проведены на белых крысах-самцах массой 150—180 г. L-аргинин гидрохлорид растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрибрюшинно из расчета 100 мг препарата на 100 г массы тела животного за 30 мин до сеанса гипероксии. Компрессию и декомпрессию проводили со скоростью 2 атм/мин. Поставлено 4 серии опытов: I — контрольные животные, которым за 30 мин до опыта вводили физиологический раствор (1 мл на 100 г массы тела); II — животные, которых подвергали действию гипероксии (6 ати) до наступления судорог. Судороги наступали через 15—25 мин, в среднем через 20 мин; III — животные, которым вводили раствор аргинина из расчета 100 мг на 100 г массы тела и забивали через 30 мин после инъекции; IV — животные, которым вводили аргинин и через 30 мин подвергали действию кислорода. В барокамеру помещали одновременно двух животных: «незащищенное» и «защищенное» аргинином. Декомпрессию проводили при наступлении судорог у «незащищенной» крысы. Судороги у «защищенных» животных в этот период не наступали. В каждой серии использовали по 12—15 животных. Крыс декапитировали, с максимальной быстротой извлекали мозг.

Определение активности глутаминазы. Источником фермента служил гомогенат больших полушарий мозга, приготовленный на трис-HCl-буфере pH 8,1 из расчета 100 мг ткани в 1 мл буфера. Инкубационная смесь содержала 0,5 мл гомогената, 1 мл глутамин (10 мкмоль) и 0,5 мл (35 мкмоль) NaH_2PO_4 — для определения ФЗГ или 0,5 мл (105 мкмоль) NaHCO_3 — для определения ФНГ. Контролем служили пробы со всеми добавками без субстрата и пробы, содержащие только глутамин. Пробы инкубировали 30 мин при 37°C, инактивировали добавлением 0,5 мл 12% ТХУ, центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли прирост аммиака фенолгипохлоритным методом [14].

Определение активности ГДК. Активность ГДК определяли по количеству ГАМК, образующейся при инкубации гомогената мозга с глутаминовой кислотой. Инкубационная смесь содержала в 2 мл калий-фосфатного буфера pH 6,4: ткани мозга 50 мг, глутаминовой кислоты 13,5 мкмоль, пиридоксальфосфата 2,5 мкмоль. Контролем служили пробы со всеми добавками, сразу же инактивированные 12% ТХУ. Прирост ГАМК определяли фенолгипохлоритным методом [15].

В опытах *in vitro* изучали влияние добавок аргинина и мочевины на активность глутаминазы и ГДК. Инкубационная смесь для обоих ферментов имела тот же состав, что и в опытах *in vivo*, и содержала аргинин в концентрациях 0,1, 0,5, 1,0 и 2,0 мкмоль/мл пробы или мочевины в концентрациях 10 и 20 мкмоль/мл.

Результаты

Предварительное введение аргинина животным, подвергнутым действию 6 ати кислорода, отодвигает время наступления судорог в $2\frac{1}{2}$ раза по сравнению с их наступлением у «незащищенных» животных. Выживаемость «защищенных» животных составляет 100%.

Активность ФЗГ у контрольных животных равна $44,3 \pm 2,2$ мкмоль аммиака на 1 г ткани, активность ФНГ — $20,2 \pm 0,57$ мкмоль/г (табл. 1). Это согласуется с результатами [16] по определению активности глутаминаз в митохондриях мозга. Повышенное давление кислорода ингибирует обе формы глутаминазы мозга. Активность ФНГ снижается на 51%, активность ФЗГ на 45%.

Обнаруженное в наших экспериментах ингибирующее действие гипероксии на глутаминазы мозга позволяет сделать вывод, что под дей-

ствием этого фермента не происходит избыточной продукции аммиака в условиях гипероксии.

При введении аргинина контрольным животным активность ФНГ и ФЗГ снижается соответственно на 44 и 26%. У «защищенных» животных судороги наступали значительно позднее, но активность глутаминаз оставалась такой же низкой, как и у «незащищенных» животных. Действие вве-

Т а б л и ц а 1

Активность глутаминаз и ГДК мозга при гипероксии и введении аргинина ($M \pm m$)

Фермент	Контроль	Действие кислорода (6 ати, судороги, 20 мин)	Введение аргинина (100 мг на 100 г массы тела)	Действие кислорода (6 ати) + аргинин (20 мин экспозиции)
Глутаминаза ФНГ, мкмоль NH_3 на 1 г ткани	$20,2 \pm 0,6$	$9,8 \pm 1,1$ (—51)	$11,3 \pm 0,7$ (—44)	$9,7 \pm 0,9$ (—52)
ФЗГ, мкмоль NH_3 на 1 г ткани	$44,3 \pm 2,1$	$24,4 \pm 1,1$ (—45)	$32,7 \pm 3,3$ (—26)	$24,7 \pm 1,2$ (—44)
ГДК, мкмоль ГАМК на 1 г ткани	$3,1 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$ (—32)	$4,2 \pm 0,01$ (+35)	$4,0 \pm 0,1$ (+29)

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках — процент.

денного аргинина и повышенного давления кислорода на активность глутаминазы мозга оказывается односторонним.

Активность ГДК при кислородных судорогах (6 ати) снижается на 32% (см. табл. 1). Это согласуется с литературными материалами по определению активности ГДК в мозге при гипероксии [13]. Вуд и Уотсон [13] высказали предположение, что причиной ингибирования ГДК при гипероксии являются перекиси липидов.

Введение аргинина повышало активность ГДК в мозге на 35%. У «защищенных» животных активность ГДК оказалась повышенной на 29%

Т а б л и ц а 2

Влияние аргинина на активность глутаминаз и ГДК в опытах *in vitro* ($M \pm m$)

Фермент	Контроль	Количество аргинина, мкмоль/мл			
		0,1	0,5	1	2
ФНГ, мкмоль NH_3 на 1 г ткани	$20,2 \pm 0,6$		$10,4 \pm 0,6$ (—48,5)	$10,9 \pm 0,7$ (—46)	
ФЗГ, мкмоль NH_3 на 1 г ткани	$44,3 \pm 0,7$		$34,2 \pm 1,3$ (—22,8)	$35,5 \pm 1,8$ (—19,7)	
ГДК, мкмоль ГАМК на 1 г ткани	$3,1 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2$ (+37)	$4,8 \pm 0,1$ (+56)	$2,89 \pm 0,1$ (—7)	$3,37 \pm 0,04$ (+9)

по сравнению с контролем. Действие аргинина и гипероксии на активность ГДК противоположно.

Влияние аргинина на активность глутаминаз и ГДК изучено в опытах *in vitro*. В тканевых препаратах с добавками к ним аргинина в концентрации, близких к физиологическим, ингибирующее действие аргинина на обе формы глутаминазы проявляется так же, как в опытах *in vivo*. Активность ФНГ понижается на 46—48%, ФЗГ — на 19—22% (табл. 2). Интересно, что добавка мочевины также ингибирует глутаминазы, но для достижения 30% ингибирования необходима концентрация мочевины в

10—20 раз большая, чем для аргинина (табл. 3). Причина ингибирования глутаминаз под действием аргинина и мочевины может быть связана с тем, что эти соединения являются катионами. Степень ингибирования пропорциональна степени их катионных свойств.

Влияние добавок аргинина на активность ГДК зависит от его концентрации. Аргинин в концентрациях, равных физиологическим — 0,1 и

Т а б л и ц а 3

Влияние мочевины на активность глутаминаз и ГДК в опытах *in vitro*

Фермент	Контроль	Количество мочевины, мкмоль/мл	
		10	20
ФНГ, мкмоль NH_3 на 1 г ткани	$20,2 \pm 0,6$	$12,3 \pm 1,1$ (—39)	$12,9 \pm 0,9$ (—36)
ФЗГ, мкмоль NH_3 на 1 г ткани	$44,3 \pm 0,7$	$31,5 \pm 1,3$ (—29)	$34,6 \pm 1,1$ (—22)
ГДК, мкмоль ГАМК на 1 г ткани	$3,1 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,3$ (+89)	$7,9 \pm 0,3$ (+156)

и 0,5 мкмоль, активирует ГДК на 37 и 56% соответственно. Добавки аргинина в количестве 1 и 2 мкмоль не влияют на активность ГДК. Этот факт в сопоставлении с результатами, полученными *in vivo*, может свидетельствовать о возможности регуляции активности ГДК, а следовательно, и уровня ГАМК в мозге физиологическими концентрациями аргинина. Мочевина также активирует ГДК, что было нами подробно описано ранее [17].

При обсуждении механизма защитного действия аргинина обращают на себя внимание два факта. Это возможность проникновения введенного аргинина непосредственно в мозг и возможность расщепления внутрибрюшинно введенного аргинина высокоактивной аргиназой печени на мочевину и орнитин.

Сведения о проницаемости гематоэнцефалического барьера для аргинина несколько противоречивы. Имеются данные, что после внутрибрюшинного введения аргинина его концентрация в мозге не изменяется, но резко возрастает количество гуанидиновых соединений [18]. Другие авторы отмечают, что после инъекции аргинина его концентрация в мозге и печени возрастает примерно в 4 раза [19]. Следует обратить внимание, что основные аминокислоты, как и нейтральные, транспортируются в мозг двумя независимыми транспортными системами и K_m для аргинина достаточно низка [20]. В этом случае возможно прямое действие аргинина на активность ферментов в мозге.

Нельзя исключить и возможность расщепления введенного аргинина в печени с образованием мочевины. Содержание мочевины в тканях после введения защитной дозы аргинина возрастает в $2^{1/2}$ —3 раза. Мочевина также является антигипероксическим соединением [17].

Высокая эффективность аргинина как антигипероксического соединения может быть связана с его многообразными биологическими эффектами. Введение аргинина повышает содержание в крови инсулина и соматотропного гормона [21—23], в печени аргинин активирует NaK-АТФ-азу [24], каталазу [25] и ацетилглютаматсинтетазу [26].

Согласно нашим материалам, глутаминазы мозга не участвуют в реализации антигипероксического эффекта аргинина. Одним из важных механизмов защитного действия аргинина является активирование глутаматдекарбоксилазы и поддержание таким образом уровня ГАМК, который служит одним из тестов глубины кислородного отравления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петровский Б. В., Ефунн С. Н. — В кн.: Гипербарическая оксигенация. М., 1975, с. 3—10. — 2. Жиронкин А. Г. Кислород. Физиологическое и токсическое действие. Л., 1972. — 3. Гершеневич З. С., Кричевская А. А. — «Биохимия», 1960, т. 25, № 5, с. 790. — 4. Гершеневич З. С., Кричевская А. А. и др. — В кн.: Биохимия и функция нервной системы. Л., 1967, с. 97. — 5. Гершеневич З. С., Кричевская А. А. и др. — В кн.: Роль гаммааминомасляной кислоты в деятельности нервной системы. Л., 1964, с. 28. — 6. Гершеневич З. С., Векслер Я. И. — «Биохимия», 1963, т. 28, № 6, с. 937. — 7. Roberge A., Charlonneau R. — «Rev. canad. Biol.», 1968, v. 27, p. 321. — 8. Najarian H. — «Am. J. Med.», 1956, v. 21, p. 832. — 9. Svenneby G. — «J. Neurochem.», 1970, v. 17, p. 1591. — 10. Katanuma N., Katsunuma T., Tomino J. et al. — «Advanc. Enzym. Regulat.», 1968, v. 6, p. 227. — 11. Tate S., Meister A. — «J. molec. Chem.», 1975, v. 250, p. 4619. — 12. Svenneby G., Torgner L., Kvamme E. — «J. Neurochem.», 1973, v. 20, p. 1217. — 13. Wood J., Radomsky M., Watson W. — «Canad. J. Biochem.», 1971, v. 49, p. 543. — 14. Brown R., Duda G., Korkes S. et al. — «Arch. Biochem.», 1957, v. 66, p. 301. — 15. Kitaka Sh., Nakano V. — «J. Biochem. (Tokyo)», 1969, v. 66, p. 87. — 16. Оганесян В. С., Бунатян Г. Х., Саакян Ж. Д. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Т. 7. Ереван, 1972, с. 18. — 17. Кричевская А. А., Шугалей В. С. и др. — «Вопр. мед. химии», 1974, № 3, с. 294. — 18. Шортанова Т. Х. Изв. СКНЦ ВП, 1973, № 3, с. 70. — 19. Roberge A., Charlonneau R. — «Life Sci.», 1969, v. 8, p. 369. — 20. Pardridge N., Oldendorf N. — «Biochim. biophys. Acta», 1975, v. 401, p. 128. — 21. Ponte C., Gaudier B., Decoinck B. et al. — «Ann. Endocr.», 1973, v. 34, p. 66. — 22. French G. W., Baum D., Porte D. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. J.)», 1971, v. 137, p. 858. — 23. Shizume K., Matsuzaki F., Sawano Sh. — «Endocr. jap.», 1971, v. 18, p. 253. — 24. Luly P., Verna R. — «Biochim. biophys. Acta», 1974, v. 367, p. 109. — 25. Kojima K., Asano H., Shimado K. — «Igaku to Seibutsugaku (Med. a. Biol.)», 1973, v. 86, p. 321. — 26. Shigesada K., Tatibana M. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1971, v. 44, p. 1117.

Поступила 10/1 1977 г.

THE PROTECTIVE EFFECT OF ARGININE IN HYPEROXIA. ACTIVITY OF GLUTAMINASE AND GLUTAMATE DECARBOXYLASE IN BRAIN

A. A. Krichevskaya, V. S. Shugaley, E. Z. Tsvetnenko, A. A. Ananyan

Chair of Biochemistry, State University, Rostov-on-Don

Activity of glutaminase (both phosphate-dependent and phosphate-independent forms of the enzyme) as well as glutamate decarboxylase activity were studied in hyperoxia (6 at) and under conditions of protection by means of arginine from the effect of hyperoxia. In hyperoxia activity of phosphate-dependent and phosphate-independent forms of glutaminase was decreased by 45% and 51%, respectively. At the same time, glutamate decarboxylase activity was decreased by 32%. Arginine showed a protective effect, delaying the time of oxygen convulsions onset by 2.5-fold. The low activities of glutaminases were maintained but the glutamate decarboxylase activity was increased and even exceeded the control level by 29%. A mechanism of the protective effect of arginine is discussed.

УДК 612.173.1:612.397.1

В. М. Кайкова

О СОДЕРЖАНИИ ОСНОВНЫХ ЛИПИДНЫХ ФРАКЦИЙ В МИОКАРДЕ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ СЕРДЦА ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Кафедра судебной медицины и кафедра патологической физиологии Калипинского медицинского института

С помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле исследовано содержание липидов в 5 отделах сердца практически здоровых мужчин. Обнаружено более высокое содержание триглицеридов и общих липидов в миокарде правых отделов сердца по сравнению с левыми и межжелудочковой перегородкой; фосфолипиды и незатерифицированные жирные кислоты, напротив, преобладали в левых отделах сердца и межжелудочковой перегородке. Достоверно отличалось содержание свободного холестерина в правом желудочке и межжелудочковой перегородке, в левом желудочке и межжелудочковой перегородке, а также в правом и левом предсердиях. Концентрация затерифицированного холестерина в левом желудочке меньше, чем в правом, межжелудочковой перегородке и левом предсердии. Количество свободного и затерифицированного холестерина в других отделах сердца существенно не различалось.

Рядом авторов выявлены изменения содержания отдельных фракций липидов в мышце сердца при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, а также при некоторых неблагоприятных воздействиях [1—4]. Однако оценка указанных изменений у человека связана со значительными трудностями ввиду недостаточной изученности вопроса о содержании основных липидных фракций в миокарде здоровых людей. В настоящей работе представлены результаты исследования суммарного содержания общих липидов и концентраций основных липидных фракций в миокарде 5 отделов сердца (правого и левого предсердий, правого и левого желудочков и межжелудочковой перегородки) здоровых мужчин.

М е т о д ы

Изучен миокард указанных выше отделов сердца из 10 трупов мужчин в возрасте от 23 до 63 лет, погибших на месте происшествия от повреждений тела и не употреблявших незадолго до смерти спиртных напитков. Данные вскрытия, результаты гистологического исследования в совокупности с катанестическими сведениями, полученными из расспросов родственников погибших, позволяли считать последних практически здоровыми людьми. Взятие материала производили через 2—16 ч после наступления смерти. После вскрытия грудной клетки выделяли сердце, исследовали его макроскопически, иссекали по два образца миокарда каждого отдела сердца, промывали их физиологическим раствором, подсушивали фильтровальной бумагой, взвешивали на торзионных весах. Одну серию проб в последующем высушивали до постоянной массы, другую — гомогенизировали по льду в смеси из 2 частей хлороформа и 1 части метанола. Экстракт липидов отмывали от нелипидных примесей [5]. Общие липиды фракционировали методом проточной горизонтальной тонкослойной хроматографии [6]. В качестве сорбента использовали силикагель (ЧССР). Пластинки с силикагелем активировали 20 мин при 120°C. После удаления растворителя при 40°C в токе азота липиды растворяли в 0,2 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и наносили $\frac{1}{6}$ часть на пластинку с помощью микропипетки, снабженной дозирующей поршневой насадкой. Хроматографию вели в системе: *n*-гексан — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота в соотношении 75 : 15 : 1,25. Продолжительность разгонки 40 мин. Отдельные фракции идентифицировали с помощью «свидетелей» и по величине R_f . Хроматограммы проявляли йодом в течение 8—10 ч при комнатной температуре, после чего определяли содержание индивидуальных липидных фракций [7]. Оптическую плотность растворов измеряли фотометрически на ФЭК-56М. Для построения калибровочных кривых, использованных при вычислении концентрации липидов, применяли следующие вещества: лецитин, холестерин, холестерин-стеарат, олеиновую кислоту. В полученных экстрактах определяли количество общего липидного фосфора [8]. Вычисляли суммарное содержание общих липидов. Концентрацию липидных фракций выражали в миллиграммах на 100 г сухого веса миокарда. Результаты обрабатывали статистически [9].

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

Основные фракции липидов: фосфолипиды, триглицериды, неэстерифицированные жирные кислоты (НЭЖК), свободный холестерин и эстерифицированный холестерин обнаружены во всех отделах сердца. Как видно из данных, представленных в таблице, суммарное содержание общих липидов и количество индивидуальных липидных фракций в миокарде исследуемых отделов сердца были различными.

По концентрации общих липидов различные отделы сердца распределялись следующим образом: правое предсердие > левое предсердие > правый желудочек \approx левый желудочек > межжелудочковая перегородка. Достоверно различалось содержание общих липидов в миокарде правого и левого предсердий, правого предсердия и правого желудочка ($P < 0,001$), правого желудочка и межжелудочковой перегородки ($P = 0,02$), левого желудочка и межжелудочковой перегородки ($P = 0,001$).

Содержание свободного холестерина было наибольшим в миокарде левого предсердия, наименьшим — в межжелудочковой перегородке. Статистически достоверными были различия концентраций свободного холестерина в правом желудочке и межжелудочковой перегородке, в левом и правом предсердиях ($P = 0,02$), а также в левом желудочке и межжелудочковой перегородке ($P = 0,04$). Наибольшее количество эстерифицированного

холестерина выявлено в правом желудочке сердца, наименьшее — в левом желудочке. Содержание эстерифицированного холестерина в левом желудочке было достоверно меньше, чем в левом предсердии ($P < 0,001$), правом желудочке ($P = 0,004$) и в межжелудочковой перегородке

Содержание липидов в различных отделах сердца здоровых мужчин, мг на 100 г сухой массы миокарда

Отделы сердца	Общие липиды	Фракции липидов				
		фосфолипиды	триглицериды	НЭЖК	свободный холестерин	эстерифицированный холестерин
Правое предсердие	13700±394	5580±113	6830±396	570±41,8	410±32,9	275±13,3
Правый желудочек	10100±205	6100±116	2860±167	375±41,8	456±29,6	319±25,1
Левое предсердие	10400±247	6710±113	2060±214	800±35,5	495±14,6	295±14,2
Левый желудочек	10100±100	7500±114	1250±41,8	605±50,6	436±21,7	220±14,2
Межжелудочковая перегородка	9560±94	7400±104	840±50,2	715±41,8	351±22,6	290±17,1

($P = 0,04$). Концентрации свободного и эстерифицированного холестерина в других отделах сердца существенно не различались.

Максимальное содержание триглицеридов обнаружено в правом предсердии, минимальное — в межжелудочковой перегородке, причем триглицериды преобладали в правых отделах сердца по сравнению с левыми отделами и межжелудочковой перегородкой ($P < 0,001$). Вместе с тем концентрация триглицеридов в предсердиях была больше, чем в соответствующих желудочках ($P < 0,01$).

Для фосфолипидов установлены противоположные различия: наибольшее содержание их отмечено в левом желудочке, наименьшее — в правом предсердии. Концентрация фосфолипидов в правых отделах сердца была ниже, чем в левых и межжелудочковой перегородке ($P < 0,001$). В правом желудочке фосфолипиды содержались в большем количестве, чем в правом предсердии ($P = 0,005$), а в левом желудочке — больше, чем в левом предсердии ($P < 0,001$). Концентрации фосфолипидов в левом желудочке и межжелудочковой перегородке были почти одинаковыми.

НЭЖК, как и фосфолипиды, преобладали в левых отделах сердца и межжелудочковой перегородке ($P < 0,01$), в то же время количество НЭЖК, как и триглицеридов, в правом предсердии оказалось больше, чем в правом желудочке ($P < 0,001$), в левом предсердии — больше, чем в левом желудочке ($P = 0,006$). Максимальное содержание НЭЖК выявлялось в левом предсердии, минимальное — в правом желудочке.

Таким образом, результаты проведенного исследования указывают на обратное соотношение между содержанием фосфолипидов и НЭЖК, с одной стороны, и общих липидов и триглицеридов в миокарде различных отделов сердца, с другой; фосфолипиды и НЭЖК в наибольших количествах содержатся в левых отделах сердца, общие липиды и триглицериды — в правых отделах сердца; однако фосфолипиды преобладают в миокарде желудочков, а общие липиды, НЭЖК и триглицериды — в миокарде предсердий. Для свободного и эстерифицированного холестерина такой зависимости не установлено. Достоверно различается содержание свободного холестерина в правом желудочке и межжелудочковой перегородке, левом желудочке и межжелудочковой перегородке, а также в правом и левом предсердиях. Эстерифицированный холестерин в левом желудочке содержится в меньшем количестве, чем в правом желудочке, левом предсердии и межжелудочковой перегородке. Содержание свободного и эстерифицированного холестерина в других отделах сердца достоверно не различается. Следовательно, миокард каждого отдела сердца здоровых мужчин характеризуется определенным количественным составом основных липидных фракций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абидов А. А. — «Мед. ж. Узбекистана», 1973, № 10, с. 30—33. — 2. Про-
данов А., Илинов П., Харизанова Н. — В кн.: Проблемы на сърдечно-
съедовите заболявания. Т. 1. София, 1973, с. 35—42. — 3. Ramakrishnan S.,
Balasubramanyam K. — «Indian J. exp. Biol.», 1973, v. 11, p. 225—226. —
4. Vasdev S. C., Chakravarti R., Subramanyam D. et al. — «Cardio-
vasc. Res.», 1975, v. 9, p. 134—140. — 5. Folch J., Lees M., Sloane-Stan-
ley G. H. — «J. biol. Chem.», 1957, v. 226, p. 497—509. — 6. Покровский Е. А.,
Каргаполов А. В. — «Лабор. дело», 1972, № 6, с. 337—341. — 7. Marsh J. B.,
Weinstein D. B. — «J. Lipid Res.», 1966, v. 7, p. 574—576. — 8. Baginski E. S.,
Foa P. P., Zask B. — «Clin. Chem.», 1967, v. 13, p. 326—332. — 9. Мончеви-
чюте-Эрингене Е. В. — «Пат. физиол.», 1964, № 4, с. 71—78.

Поступила 14/1 1977 г.

ON THE CONTENT OF MAIN LIPID FRACTIONS IN VARIOUS PARTS OF MYO- CARDIUM OF HEALTHY PEOPLE

V. M. Kaykova

Medical School, Kalinin

Content of lipids was studied in five parts of myocardium of healthy people by means of thin-layer chromatography on silica gel. The higher content of triglycerides and total lipids was found in dexter parts of heart as compared with sinister parts and septum interven-
triculare. The same distribution was not shown for free and esterified cholesterol.

УДК 615.357.453 + 615.357.631].015.43:612.351.11

Н. Н. Клоева

ВЛИЯНИЕ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Показано ингибирующее действие стероидных гормонов (половых и кортикостероидов) на активность глутаматдегидрогеназы митохондрий печени крыс. Блокирование гуанидиновых групп аргинина в митохондриальных препаратах снижало ингибирующее действие половых гормонов и предотвращало действие кортикостероидов. Результаты исследований свидетельствуют об участии гуанидиновых групп аргининовых остатков глутаматдегидрогеназы в реализации ингибирующего влияния стероидных гормонов.

Стероидные гормоны регулируют активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ, L-глутамат: НАД(Ф)-оксидоредуктаза). На препаратах кристаллической ГДГ из печени быка показано торможение ее активности половыми гормонами [1—3]. Ингибирующее действие половых гормонов на активность ГДГ обусловлено образованием комплекса гормона с ферментным белком [1].

Механизмы регулирующего действия стероидных гормонов изучены недостаточно. Показано, что некоторые половые гормоны (андрогены) связываются с основными белками клеточных рецепторов [4]. Имеются данные, свидетельствующие о связывании кортикостероидов с богатой аргинином гистоновой фракцией и с гуанидиновыми группами свободного аргинина [5—7]. На препаратах кристаллической ГДГ нами было установлено снижение ингибирующего действия половых гормонов при блокировании аргининовых остатков фермента [8].

В настоящей работе изучено влияние стероидных гормонов (половых и кортикостероидов) на активность ГДГ митохондрий печени крыс. Показано снижение ингибирующего действия половых гормонов и предотвращение действия кортикостероидов при блокировании гуанидиновых групп аргинина в митохондриальных препаратах.

Материалы

В работе использовали крыс-самцов массой 180—200 г. После декапитации животных печень извлекали, промывали 0,25 М раствором сахарозы и измельчали в гомогенизаторе с 0,25 М раствором сахарозы pH 7,6, содержащим 10^{-4} М ЭДТА в соотношении 1 : 4. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 600 g, осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость вновь центрифугировали 20 мин при 12 000 g. Осадок (митохондрии) промывали 2 раза 0,25 М раствором сахарозы. Отмытые митохондрии разрушали 0,5% раствором тритона X-100 в 0,05 М К-фосфатном буфере при 4°C в течение 60 мин при непрерывном помешивании и центрифугировали при 12 000 g в течение 1 ч. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость использовали для определения активности ГДГ. Состав реакционной среды: 0,05 М трис-HCl-буфер pH 8,2, 10^{-5} М ЭДТА, 0,01 М L-глутаминовая кислота, $6 \cdot 10^{-5}$ М НАД⁺, 0,05 мл надосадочной жидкости, гормоны — 20 мкг, общий объем 3 мл. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-16 через каждые 15 с. Результаты выражали в наномолях НАД·Н на 1 мг белка в 1 мин. Белок определяли спектрофотометрически при 310 нм [9].

Аргинин в исследуемых препаратах определяли по модифицированному методу Сакагучи [10].

Аргинин митохондриальных препаратов блокировали бисульфитглиоксалем, являющимся специфическим реагентом на гуанидиновые группы аргинина [11, 12]. Для этого 1 мл надосадочной жидкости инкубировали с 3 мг бисульфитглиоксала, растворенного в 0,2 М Na-бикарбонатном буфере pH 9,5 в течение 1 ч при 4°C. Избыток глиоксала удаляли пропусканием смеси через колонку с сепадексом G-50, уравновешенную К-фосфатным буфером pH 8,2.

Результаты и обсуждение

Результаты опытов показали, что различные стероидные гормоны тормозят глутаматдегидрогеназную активность митохондриальных препаратов (табл. 1). Наиболее выраженное ингибирующее действие оказывали диэтилстильбестрол, синестрол и прогестерон, снижая активность на 85,79

Таблица 1

Влияние стероидных гормонов на активность ГДГ митохондрий печени крыс

Стероидный гормон	Активность ГДГ, нмоль НАД·Н на 1 мг белка в 1 мин
Контроль	51,98±1,09
Диэтилстильбестрол	7,72±0,29
Синестрол	10,87±0,81
Прогестерон	21,28±0,61
Тестостерон	37,96±1,31
Дезоксикортикостерон	36,72±2,95
Гидрокортизон	41,56±1,03

Таблица 2

Определение аргинина в митохондриальных препаратах до и после блокирования гуанидиновых групп

№ опыта	Аргинин, мкг на 1 мг белка	
	в отсутствие бисульфитглиоксала	в присутствии бисульфитглиоксала
1	80,4	60,5
2	88,8	65,5
3	82,4	62,8
4	87,6	64,9
5	77,2	57,1
$M \pm m$	83,3±2,19	62,0±1,46

и 59% соответственно. Тестостерон, дезоксикортикостерон и гидрокортизон тормозили ферментативную активность в значительно меньшей степени — на 27,29 и 18%.

Определение аргинина в митохондриальных препаратах показало, что на 1 мг белка приходится 83 мкг аргинина. После блокирования гуанидиновых групп аргинина бисульфитглиоксалем его содержание снижалось на 26% и составляло 62 мкг на 1 мг белка митохондриального препарата (табл. 2).

Далее были поставлены опыты по выяснению влияния стероидных гормонов на активность ГДГ в условиях блокирования гуанидиновых групп ферментного препарата (табл. 3).

Как следует из табл. 3, бисульфитглиоксаль не оказывал влияния на активность митохондриальной ГДГ. Ингибирующее влияние диэтилстильбестрола, синестрола и прогестерона в этих условиях значительно снижалось. Так, если до блокирования гуанидиновых групп гормоны ингибиро-

гали активность ГДГ в среднем на 85, 79 и 59% соответственно, то после блокирования — на 69, 66 и 17%. Ингибирующее действие тестостерона, дезоксикортикостерона и гидрокортизона в условиях блокирования гуанидиновых групп аргинина митохондриальных препаратов не проявлялось.

Эти данные согласуются с результатами опытов, в которых было показано снижение ингибирующего действия половых гормонов на активность

Т а б л и ц а 3

Влияние стероидных гормонов на активность ГДГ до и после блокирования гуанидиновых групп аргинина

Стероидный гормон	Активность ГДГ, нмоль НАД·Н на 1 мг белка в 1 мин	
	в отсутствие бисульфитгликося	в присутствии бисульфитгликося
Контроль	51,98±1,09	47,96±1,80
Диэтилстильбестрол	7,72±0,29	14,70±0,60
Синестрол	10,87±0,81	16,39±0,33
Прогестерон	21,28±0,61	39,85±1,10
Тестостерон	37,96±1,31	48,05±1,41
Дезоксикортикостерон	36,72±2,95	47,48±0,88
Гидрокортизон	41,56±1,03	49,32±0,94

кристаллической ГДГ из печени быка в условиях блокирования гуанидиновых групп аргининовых остатков фермента [8]. Сопоставление данных, полученных на митохондриальных препаратах, с результатами исследований на кристаллической ГДГ позволяет заключить, что в реализации ингибирующего влияния стероидных гормонов участвуют гуанидиновые группы аргининовых остатков фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Титова Г. В., Ключева Н. Н. — «Биохимия», 1976, т. 41, № 3, с. 487 — 490.
2. Bitensky M. W., Yel'dino K. L., Tomkins G. M. — «J. biol. Chem.», 1965, v. 240, p. 663—667.
3. Yel'ding K. L., Tomkins G. M. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1960, v. 46, p. 1483—1488.
4. Hraschek A., Debreczeni L., Endröczy E. — «Endocrinologie», 1974, Bd 63, S. 390—395.
5. Monder C., Walker M. C. — «Biochemistry (Wash.)», 1970, v. 9, p. 2489—2497.
6. Porcelli G., Di Jorio M., Rafficri M. et al. — «Farmaco. Ed. Prat. Ed. Sci.», 1974, v. 39, p. 548—550.
7. Sluysen M. — «J. molec. Biol.», 1966, v. 19, p. 591—595.
8. Ильин В. С., Титова Г. В., Ключева Н. Н. — «Вопр. мед. химии», 1976, т. 22, с. 473.
9. Itzhaki D., Gill M. — «Analyt. Biochem.», 1964, v. 9, p. 401—410.
10. Akamatsu S., Watanabe T. — «J. Biochem. (Tokyo)», 1961, v. 49, p. 566—569.
11. Nakaya K., Horiniski H., Shirata K. — «J. Biochem. (Tokyo)», 1967, v. 61, p. 345—351.
12. Takahashi K. — «J. biol. Chem.», 1968, v. 243, p. 6171—6179.

Поступила 25/1 1977 г.

EFFECT OF STEROID HORMONES ON GLUTAMATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RAT LIVER MITOCHONDRIA

N. N. Klyueva

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Steroid hormones (sex hormones and corticosteroids) were found to inhibit the activity of glutamate dehydrogenase from rat liver mitochondria in vitro. After blocking of arginine guanidine groups in the mitochondrial preparations the inhibitory effect of sex hormones was decreased and that of corticosteroids — prevented. The data obtained suggest that guanidine groups of arginine residues in glutamate dehydrogenase participate in realization of the inhibitory effect of steroid hormones.

Н. И. Кузьмак

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И ТИРЕОИДЭКТОМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ПЕЧЕНИ У КРЫС

Червоноградская городская централизованная больница, кафедра общенаучных дисциплин Львовского политехнического института

В эксперименте на крысах проведено параллельное исследование влияния дозы и продолжительности введения 6-МТУ мерказолила и тиреоидэктомии на изменение уровня сиаловых кислот в крови и печени. Показано, что при гипотиреозе содержание сиаловых кислот в крови достоверно повышено, а в гомогенате, митохондриях и микросомах печени снижено.

В настоящее время известны данные об участии щитовидной железы в регуляции уровня сиаловых кислот (СК) в крови [1—3]. Однако отсутствуют сведения о параллельном исследовании различных тиреостатических факторов на величину и корреляционную зависимость между изменениями уровня СК в структурных элементах печени и крови у крыс, остаются неясными вопросы динамики и нормализации концентрации СК в печени и сыворотке крови при экспериментальном гипотиреозе. Изучение этого может иметь немаловажное значение для уточнения механизма нарушений содержания СК в крови.

Целью настоящей работы являлось параллельное изучение действия различных доз и продолжительности введения 6-метилтиоурацила (6-МТУ), мерказолила и тиреоидэктомии на содержание СК в печени и сыворотке крови крыс в динамике.

М е т о д и к а

Опыты проводили на 247 белых беспородных крысах-самцах массой от 180 до 220 г. Экспериментальные модели гипотиреоза получали по методике, описанной [4, 5]. Всех животных разделили на 4 группы: 1-я — интактные (40 крыс); 2-я — с 6-МТУ-гипотиреозом (135 крыс), который вызывали ежедневным введением в желудок с помощью зонда по 50 мг 6-МТУ на 100 г массы в течение 3 нед; 3-я — с мерказолиловым гипотиреозом (54 крысы), который был вызван таким же способом, как и у крыс 2-й группы, но при ежедневном введении на протяжении 3 нед по 20 мг мерказолила на 100 г массы животного; 4-я — с гипотиреозом (18 крыс), обусловленным тотальной тиреоидэктомией. Животные опытных групп с 6-МТУ- и мерказолиловым гипотиреозом в свою очередь были еще разделены поровну на 3 подгруппы: в первые подгруппы (по 18 крыс) входили животные, получавшие тиреостатики по описанным выше методикам, во вторые — крысы, которым дозу вводимых препаратов увеличивали в 2 раза по сравнению с дозами в 1-х подгруппах, и в третьи — крысы, у которых продолжительность введения тиреостатических препаратов была в 2 раза выше по сравнению с таковой в первых подгруппах. Кроме того, у крыс 2-й группы изучали динамику СК в печени. Для этого начиная с 6-го дня после введения и на протяжении 54 дней умерщвляли по 9 крыс с немедленным забором крови и отпрепарированием печени. Частичный забор крови осуществляли в динамике эксперимента и после него с помощью шприца из хвостовой вены [3].

Для одного определения содержания СК в гомогенате, митохондриях и микросомах печени объединяли печень 3 животных. Печень перфузировали в 0,85% NaCl при 2—4°C, 25% гомогенат готовили на 0,05 М KCl, приготовленном на калий-фосфатном буфере pH 7,4. Ткани размельчали в стеклянном гомогенизаторе в течение 3—5 мин. Структурные элементы печени выделяли методом дифференциального центрифугирования в KCl-фосфатном буфере. Ядра осаждали вместе с остатками тканей при 630 g в течение 10 мин, осадок отбрасывали. Надосадочную жидкость опять центрифугировали в течение 20 мин при 3000 g и выделяли митохондрии. К надосадочной жидкости добавляли CaCl₂ до конечной концентрации 0,013 М и оставляли при 4°C на 30 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 12 000 g для осаждения фракции микросом. Полученные фракции митондрий и микросом промывали KCl-фосфатным буфером при соответствующих режимах центрифугирования, после чего их разрушали путем повторного замораживания и оттаивания. Из разрушенных структурных элементов печени растворимые белки и СК экстрагировали физиологическим раствором в течение 2 ч при комнатной температуре, осадки отделяли центрифугированием. В надосадочной жидкости определяли содержание белка микробуриновым методом [6], а СК — методом Свеннерхольма [7] в модификации Миеттиненна и Такки-Луккайнена [8] с использованием смолы дауэкс (1×8, 100—200 меш).

В качестве тиреостатических препаратов использовали 6-МГУ и мерказолил отечественного производства (Харьковский завод эндокринных препаратов). Для калибровки стандартной кривой пользовались нейраминозой, любезно предоставленной нам И. В. Цветковой из лаборатории обмена углеводов Института биологической и медицинской химии АМН СССР. О функциональном состоянии щитовидной железы судили по количеству связанного с белком йода (СБЙ) в сыворотке крови и по изменению массы животных. Кроме того, также учитывали характерные симптомы гипотиреоза (малая подвижность, сонливость, отсутствие аппетита и др.). Концентрацию СБЙ в крови определяли модифицированным методом Баркера и соавт. [9, 10]. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

После окончания введения тиреостатиков или через 24 дня от момента удаления щитовидной железы у крыс отмечается значительное увеличение общей массы (на 35—52%). Последнее в определенной ме-

Таблица 1

Содержание СК в сыворотке крови (в мг%) и печени (в мкг на 1 г белка) контрольных крыс и животных с экспериментальным гипотиреозом через 24 дня от начала опыта

Группа крыс	Статистический показатель	Содержание СК			
		в крови	в печени		
			в гомогенатах	в митохондриях	в микросомах
Контрольная	<i>n</i>	40	13	13	13
	<i>M ± m</i>	108,0 ± 2,1	2,86 ± 0,08	14,6 ± 0,09	14,2 ± 0,19
С 6-МГУ-гипотиреозом (2-я группа):	<i>n</i>	18	6	6	6
первая подгруппа	<i>M ± m</i>	133,6 ± 2,9	2,02 ± 0,04	8,94 ± 0,05	8,22 ± 0,06
	<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
вторая подгруппа	<i>n</i>	18	6	6	6
	<i>M ± m</i>	178,0 ± 3,3	1,92 ± 0,17	6,94 ± 0,39	6,22 ± 0,19
	<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
третья подгруппа	<i>n</i>	18	6	6	6
	<i>M ± m</i>	145,8 ± 4,2	2,00 ± 0,23	7,48 ± 0,18	6,95 ± 0,23
	<i>P</i>	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
С мерказолиловым гипотиреозом (3-я группа):	<i>n</i>	18	6	6	6
первая подгруппа	<i>M ± m</i>	132,0 ± 2,2	2,66 ± 0,07	9,35 ± 0,10	10,16 ± 0,06
	<i>P</i>	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001
вторая подгруппа	<i>n</i>	18	6	6	6
	<i>M ± m</i>	146,0 ± 2,4	2,09 ± 0,17	7,32 ± 0,25	8,03 ± 0,20
	<i>P</i>	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
третья подгруппа	<i>n</i>	18	6	6	6
	<i>M ± m</i>	135,0 ± 3,6	2,18 ± 0,20	8,52 ± 0,18	8,48 ± 0,21
	<i>P</i>	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
С гипотиреозом, вызванным тиреоидэктомией (4-я группа)	<i>n</i>	18	6	6	6
	<i>M ± m</i>	182,4 ± 3,9	1,81 ± 0,04	6,25 ± 0,07	6,89 ± 0,06
	<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

ре зависит от дозы и продолжительности введения в организм тиреостатиков. Установлено наибольшее увеличение массы (в 1,5—1,6 раза) у крыс, получавших удвоенные дозы тиреостатиков. У всех крыс с экспериментальным гипотиреозом через 24 дня от начала экспе-

римента были выявлены самые низкие величины СБЙ крови. Так, у крыс, получавших средние дозы 6-МТУ, содержание СБЙ составило $0,6 \pm 0,02$ мкг%, у получавших мерказолил — $0,8 \pm 0,04$ мкг%, а при гипотиреозе, вызванном тиреоидэктомией, — $0,2 \pm 0,001$ мкг% (у контрольных крыс оно равнялось $2,81 \pm 0,01$ мкг%). Полная нормализация уровня СБЙ во всех опытных группах наблюдалась через 24—30 дней после окончания введения тиреостатиков. У крыс с тиреоидэктомией или у тех животных, которым вводили большие дозы тиреостатиков, этот процесс затягивается до 48 дней и более после окончания эксперимента. Данные по определению содержания СК в печени и крови крыс представлены в табл. 1.

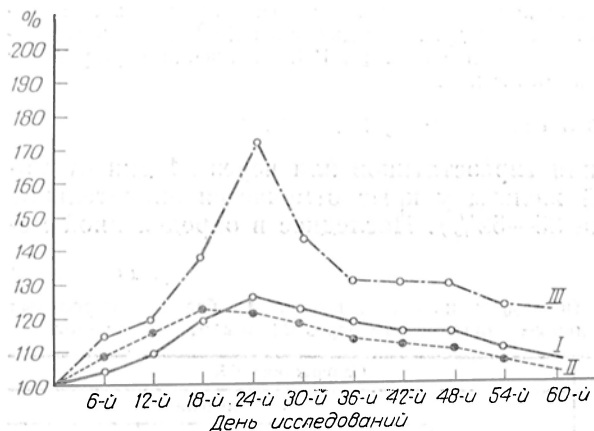


Рис. 1. Содержание СК в сыворотке крови (в % к контролю) в разные сроки после начала эксперимента. I — крысы, у которых гипотиреоз вызывали введением 6-МТУ; II — крысы с мерказолиловым гипотиреозом; III — крысы с гипотиреозом, вызванным тиреоидэктомией.

но значительное повышение содержания СК в крови и снижении их уровня в структурных элементах печени по сравнению с контролем. Эти изменения находятся в определенной связи от выбора «тирестатического» фактора, дозы или продолжительности введения тиреостатика. Наибольшие изменения уровня СК в сыворотке крови установлены у крыс с тиреоидэктомией и у тех, которые получали 6-МТУ. Так, у крыс с микседемой, вызванной тиреоидэктомией, концентрация СК в крови через 24 дня после удаления железы превысила норму на 68,8%, с 6-МТУ-гипотиреозом — на 23,7%, с мерказолиловым гипотиреозом — на 22,2%.

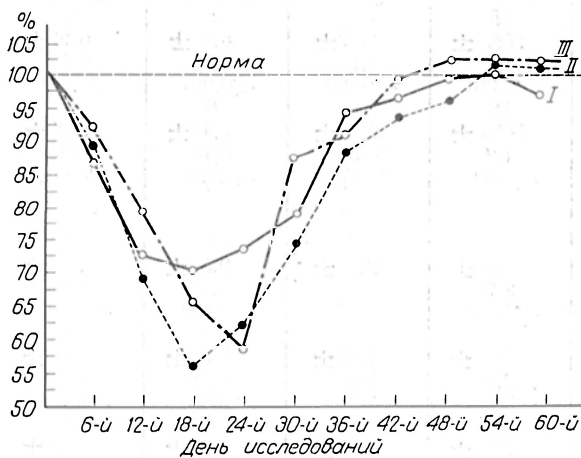


Рис. 2. Содержание СК в гомогенате (I), митохондриях (II) и микросомах (III) печени (в % к контролю) крыс с гипотиреозом, вызванным введением 6-МТУ в разные сроки после начала эксперимента.

вым гипотиреозом — на 7,0%, с микседемой — на 36,8%; при этом в митохондриях он снижается на 38,8, 36,0 и 57,2% и в микросомах — на 42,2, 28,5 и 51,5% соответственно. Наибольшие изменения содержания СК в сыворотке крови и структурных элементах печени у животных всех опытных групп выявлены в тех случаях, когда крысам удаляли щитовидные железы или вводили двойные дозы тиреостатиков (в 1,5—2,1 раза).

При изучении динамики изменений содержания СК в сыворотке крови, гомогенате и структурных элементах печени во время эксперимента и в разные сроки после него у животных всех опытных групп выявлены достоверные его нарушения, начиная с 6—12-го дня опыта и кончая 42—48-м днем. Наибольшее увеличение СК в сыворотке крови установлено через 24 дня от начала эксперимента, а в гомогенате и структурных элементах печени — через 18 дней. Полная нормализация уровня СК в крови и печени наблюдается на 54—60-й день от начала введения тиреостатиков. Исключение составляет группа крыс с гипотиреозом, вызванным тиреоидэктомией, или те животные, которым вводили большие дозы тиреостатиков. У последних нормализации содержания СК как в крови, так и в печени полностью не происходит даже на 60-й день от начала эксперимента (рис. 1, 2).

У крыс с экспериментальным гипотиреозом выявлено полное отсутствие отрицательной корреляции между повышением содержания СК в сыворотке крови и снижением их в гомогенате, митохондриях и микросомах печени. Вместе с тем положительная корреляция определяется между снижением уровня СК в гомогенате, митохондриях и микросомах у животных всех опытных групп. Самая тесная положительная корреляционная связь ($r > 0,6—0,9$) установлена между снижением уровня СК в митохондриях и микросомах у всех животных с экспериментальным гипотиреозом (табл. 2). При изучении влияния больших доз тиреостатиков на корреляцию между изменением концентрации СК сре-

Таблица 2

Показатели корреляции между изменениями уровня СК в сыворотке крови и печени крыс с экспериментальным гипотиреозом через 24 дня от начала опыта

Объект исследования	Статисти- че. к-ты показа- тель	Группа крыс									
		с 6-МТУ-гипотиреозом (n = 18)			с мерказолиловым гипотиреозом (n = 18)			с гипотиреозом, вызванным тиреоидэк- томией (n = 18)			
		печень									
		гомогенат	митохондрии	микросомы	гомогенат	митохондрии	микросомы	гомогенат	митохондрии	микросомы	
Кровь	r	-0,365	-0,289	-0,314	-0,249	-0,395	-0,456	-0,369	-0,345	-0,452	
	z	-0,38	0,29	0,32	0,25	0,41	0,49	0,38	0,46	0,48	
	P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
Гомогенат	r	—	+0,505	0,578	—	+0,468	+0,641	—	+0,690	+0,789	
	z	—	0,55	0,66	—	0,44	0,76	—	0,85	1,07	
	P	—	<0,05	<0,01	—	>0,05	<0,01	—	<0,05	<0,001	
Митохондрии	r	—	—	+0,659	—	—	+0,895	—	—	+0,979	
	z	—	—	0,79	—	—	1,45	—	—	2,27	
	P	—	—	<0,01	—	—	<0,001	—	—	<0,001	

ди изучаемых компонентов у крыс мы не нашли существенной разницы, за исключением некоторого повышения тесноты данной связи. Корреляция между показателями нормализации содержания СК в сыворотке и печени отсутствует.

Таким образом, полученный нами экспериментальный материал позволяет утверждать, что тиреостатики и тиреоидэктомия влияют на количественные изменения СК в митохондриях печени. Об этом свидетельствуют данные о снижении уровня экстрагируемых физиологическим раствором СК в митохондриях и микросомах, начиная с 12-го дня введения средних доз и с 6-го дня введения больших доз тиреостатиков. Не совсем ясны причины резкого снижения уровня СК в печени при гипотиреозе. Очевидно, они связаны со снижением активности некоторых ферментов, принимающих участие в биосинтезе и распаде СК в печени [11]. Вероятно, недостаток тиреоидных гормонов в организме приводит к резкому снижению интенсивности окислительно-восстановительных процессов, катализируемых флавопротеидными ферментами [12], а это в свою очередь не может не повлиять на действие ферментов, принимающих участие в биосинтезе СК в печени.

Механизм повышения уровня СК в крови у гипопротеидных животных не может быть связан непосредственно с причиной нарушения их биосинтеза в печени, так как их синтез в митохондриях и микросомах значительно снижен. Это предположение подтверждается полученными нами данными об отсутствии корреляции между изменениями концентрации СК в гомогенате, митохондриях и микросомах печени, с одной стороны, и между их содержанием в крови — с другой. Очевидно, решающим фактором в увеличении содержания СК в крови у данных животных является увеличение межтканевой микседематозной слизи, состоящей из различных муко- и гликопротеидов, от которых при определенных условиях может отщепляться СК с последующим попаданием в русло крови. В крови происходит их постепенное накопление, чему также, возможно, способствует процесс уменьшения выведения сиаломукопротеидов с мочой [13]. Однако, по имеющимся в литературе данным [14], механизм действия тиреоидных гормонов окончательно не изучен, поэтому вопрос об их влиянии на обмен СК в тканях и в крови остается актуальной проблемой дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаев Т. А. Изменения содержания гликопротеидов в тканях и сыворотке крови у животных с экспериментальным гипер- и гипотиреозом и у больных с поражениями щитовидной железы. Автореф. дис. канд. М., 1963. — 3. Касавина Б. С., Бабаев Т. А., Романов Ю. А. и др. — Мукополисахариды и функциональная активность щитовидной железы. Ташкент, 1973, с. 44. — 3. Кузьмак Н. И. — «Физиол. ж. СССР», 1973, № 7, с. 1114—1121. — 4. Киршенблат Я. Д. Практикум по эндокринологии. М., 1969, с. 18—26. — 5. Олецкий Э. И. — «Бюлл. exper. биол.», 1965, № 8, с. 54—56. — 6. Itzhaki D., Gill M. — «Analyt. Biochem.», 1964, v. 9, p. 401—403. — 7. Svennerholm L. — «Biochim. biophys. Acta», 1957, v. 24, p. 604—608. — 8. Miettinen T., Takki-Luukkainen J. — «Acta chem. scand.», 1959, v. 13, p. 856. — 9. Barker S. B. et al. — «J. Clin. Invest.», 1951, v. 30, p. 55—58. — 10. Степанов Г. С. — «Лаб. дело», 1965, № 10, с. 594—598. — 11. Цветкова И. В., Узбеков М. Г. — «Биохимия», 1967, № 3, с. 645—650. — 12. Rivlin R. S. — «Advanc. Enzyme Regulat.», 1970, v. 8, p. 239. — 13. Blumenkrantz N., Housay A. B. — «Acta physiol. lat.-amer.», 1962, v. 8, p. 12. — 14. Туракулов Я. Х. — «Пробл. эндокринолог.», 1971, № 6, с. 105—107.

Поступила 10/1 1977 г.

EFFECT OF THYROSTATIC PREPARATIONS AND THYROID ECTOMY ON CONTENT OF SIALIC ACIDS IN RAT BLOOD SERUM AND LIVER TISSUE

N. I. Kuz'mak

Central City Hospital, Chervonograd, Chair of General Science Disciplines, Polytechnic Institute, Lvov

Effect of experimental hypothyreosis, caused by various thyrostatic agents, on content of sialic acids was studied in blood plasma and liver tissue of white rat males. In hypothyreosis content of sialic acids was distinctly increased in blood serum but decreased in homogenate

and structure elements of liver tissue. Alteration in content of sialic acids in blood plasma correlated with their content in liver structure elements. Content of sialic acids in blood plasma and liver tissue was shown to depend on dosage and length of administration of various thyrostatic preparations. Mechanism of increase in concentration of sialic acids in blood serum under influence of experimental hypothyreosis is discussed.

УДК 616.832-008.939.6; 616.83

Ю. Л. Житнухин, В. М. Плесков

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ЭНЦЕФАЛИТОГЕННЫХ ФРАКЦИЙ БЕЛКОВ СПИННОГО МОЗГА

Лаборатория общей иммунологии отдела микробиологии и иммунологии, отдел биохимин Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Из спинного мозга быка выделен основной энцефалитогенный белок, который с помощью гель-фильтрации разделен на гомогенные полипептидные фракции, часть из которых обладала высокой энцефалитогенной активностью. Обладающие энцефалитогенной активностью основной белок и его фракции вызывали у животных образование перекрестно реагирующих антител и сенсибилизацию к внутрикожному введению энцефалитогенных препаратов. Неэнцефалитогенный основной белок сенсибилизировал животных только к данному белку и не вызывал образования определенных количеств антител. Представлены результаты аминокислотного анализа энцефалитогенного полипептида.

Для изучения демиелинизирующих заболеваний нервной системы существенное значение имеет выделение компонентов ткани мозга и определение их роли в патогенезе заболеваний. Известно, что энцефалитогенную активность ткани мозга определяет основной белок [1—4]. В задачу настоящей работы входило выделение основного белка спинного мозга и его полипептидных фракций и изучение энцефалитогенной и антигенной активности каждой из них.

М е т о д и к а

Для препаративного выделения основных белков использовали КМ-сефадекс G-25 (фирма «Pharmacia», Швеция), разделяющий смесь основных белков не только по принципу молекулярного сита, но и выявляющий ионообменные свойства. Выход белковых фракций контролировали с помощью системы «Увикорд» (ЛКВ, Швеция). Гомогенность и белковый состав полученных фракций исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Скапирование фореграмм проводили на денситометре «Integratograph CN» (фирма «Zeitz»). Аминокислотный состав энцефалитогенных полипептидов определяли с помощью аминокислотного анализатора фирмы «Хитахи». Смесь основных белков, а также энцефалитогенные полипептиды выделяли по приведенной ниже схеме.

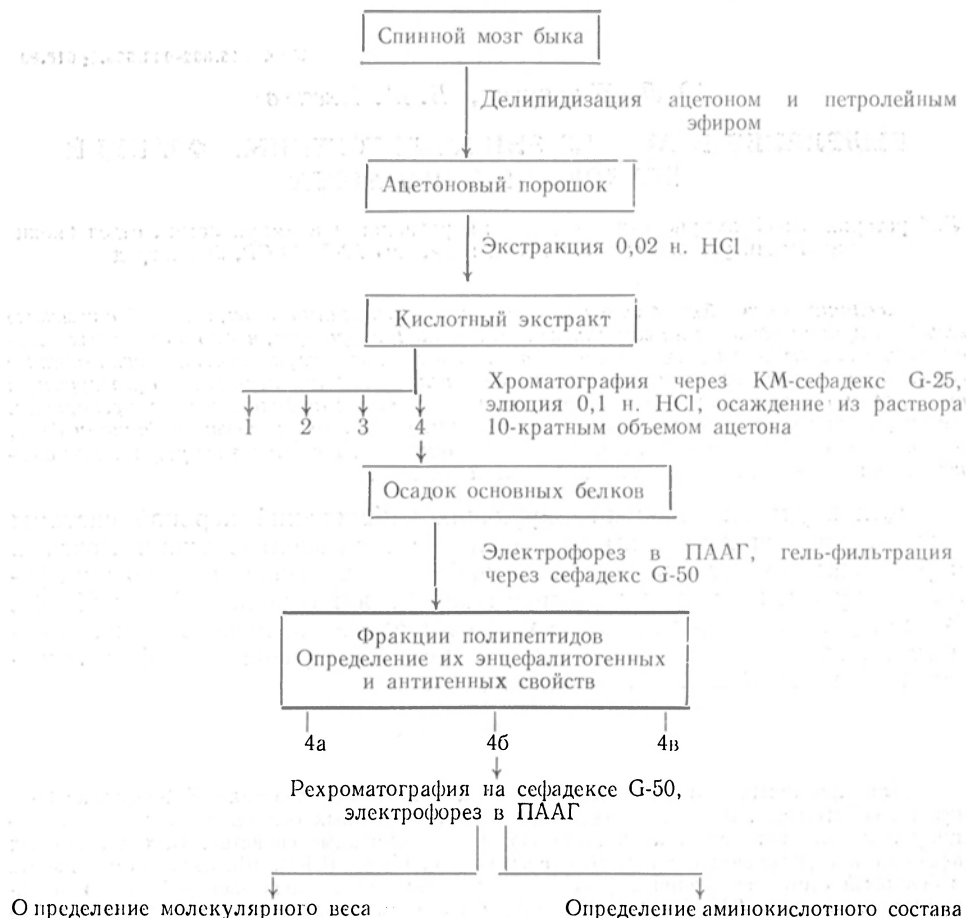
Для определения энцефалитогенной активности выделенных фракций последние вводили морским свинкам в разных дозах в 0,1 мл физиологического раствора с 0,3 мл полного адьюванта Фрейнда, содержащего 5 мг/мл сухих туберкулезных микобактерий. Эту смесь вводили однократно подкожно в подушечки лап по 0,1 мл в каждую. В сыворотках, полученных в разные сроки после сенсибилизации, определяли антитела в реакции связывания комплемента на холоду [5] с антигенами в концентрации 0,1 мг/мл белка. С помощью кожных проб выявляли развитие состояния гиперчувствительности замедленного типа, для этой цели в эпилированные участки кожи спины внутрикожно вводили по 100 мкг препарата в объеме 0,1 мл физиологического раствора. Через 24 ч регистрировали выраженность кожных реакций, учитывая диаметр участка эритемы и индурации в месте введения антигена.

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

В процессе выделения основных белков при помощи хроматографии через КМ-сефадекс G-25 были получены 4 белковые фракции (см. схему). Фракцию 1 элюировали с хроматографической колонки после обработки последней дистиллированной водой, фракции 2, 3 и 4 элюировали 0,1 н. HCl. Таким образом, белки фракций 2, 3 и 4 проявляли свойства основных белков. Эти три фракции были испытаны на энцефалитогенную активность. Оказалось, что фракции 2 и 3 не обладали способностью

индуцировать экспериментальный аллергический энцефаломиелит у морских свинок, в то время как фракция 4 обладала энцефалитогенными свойствами (табл. 1).

Получение и исследование фракций спинного мозга быка



Количество 0,1—1,0 мг фракции 4 было достаточно для развития энцефаломиелита у 92% животных. Введение 0,01—0,001 мг этой фракции вызвало возникновение клинических признаков энцефаломиелита лишь у 2 из 20 свинок. Электрофоретическое исследование основного белка фракции в ПААГ показало, что фракция 4 не гомогенна, а состоит из белков, имеющих различную электрофоретическую подвижность (см. схему). Поэтому было произведено разделение этой фракции на полипептиды с помощью гельфильтрации через сефадекс G-50, в результате чего было получено 3 белковых пика — 4а, 4б и 4в. Как видно из табл. 1, фракции 4а и 4б обладали энцефалитогенной активностью в дозе 0,01—0,001 мг, в то время как фракция 4в оказалась малоактивной.

Наличие одного симметричного пика при рехроматографии на сефадексе G-50 и одной окрашенной зоны в ПААГ позволяет в известной мере думать о гомогенности фракции 4б, которая и была использована для определения молекулярного веса и аминокислотного состава. Гель-фильтрация белка фракции 4б через сефадекс G-50 показала, что молекулярный вес полипептида этой фракции равен 3000—5000. Фракции 4а и 4б по аминокислотному составу различались между собой (табл. 2).

Фракции 3, 4, 4а и 4б были испытаны в отношении способности приводить к развитию состояния сенсибилизации, определяемого с помощью

реакции гиперчувствительности замедленного типа. Данные об этом приведены в табл. 3.

Можно видеть, что после введения различных препаратов в смеси с полным адьювантом Фрейнда у большей части животных развивалось состояние сенсибилизации к соответствующим антигенам, в том числе к неэнцефалитогенному белку (фракция 3). Перекрестное исследование кожной

Т а б л и ц а 1

Заболеемость экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом морских свинок, сенсибилизированных различными белковыми фракциями, выделенными из спинного мозга быка

Фракция	Доза, мг	Число животных в опыте	Число заболевших животных
2	1,0	3	0
3	1,0	21	0
4	1,0—0,1	30	28
4а	0,01—0,001	20	2
	1,0—0,1	18	16
	0,01—0,001	6	3
4б	1,0—0,1	26	24
	0,01—0,001	6	1
4в	1,0	3	1
	0,1	3	0

реактивности с помощью различных антигенов (данные не включены в табл. 3) показало, что введение неэнцефалитогенной фракции 3 вызывало появление кожных реакций замедленного типа только к этой фракции и животные не реагировали на внутрикожное введение фракций 4, 4а, 4б. С другой стороны, не удалось наблюдать развития кожных реакций на введение фракции 3 у морских свинок, сенсибилизированных энцефалитогенными фракциями 4, 4а или 4б. В то же время у этих животных были отмечены положительные кожные пробы с любой из энцефалитогенных фракций.

Результаты, полученные при испытании сывороток от животных на содержание комплементсвязывающих антител, представлены в табл. 4.

Фракция 3, лишенная энцефалитогенных свойств в отношении морских свинок, не вызывала образования антител. При индукции экспериментального аллергического энцефаломиелита с помощью фракции 4 35 из 51 сыворотки, взятой от морских свинок в сроки от 10 до 35 дней, содержали антитела. Из 16 сывороток от животных, сенсибилизированных фракцией 4а, в 12 были найдены антитела в сроки от 10 до 28 дней. Оказалось «положительными» 12 из 16 испытанных в те же сроки сывороток от животных, сенсибилизированных фракцией 4б, причем было отмечено наличие перекрестных реакций антисывороток против фракции 4а с фракцией 4б и антисывороток против фракции 4б с фракцией 4. В то же время антисыворотки против фракции 4 реагировали с фракцией 4б (данные не включены в табл. 4).

Основные энцефалитогенные белки с высокой биологической активностью были выделены ранее с помощью разнообразных методов [2, 3, 6—8]. Препарат, полученный Карнеги и соавт. [3], вызывал заболевание у морских свинок в дозе 1—50 мкг, а полипептид, выделенный Эйлером [8], в дозе 10—100 мкг приводил к развитию энцефаломиелита у 80—100% жи-

Т а б л и ц а 2

Аминокислотный состав энцефалитогенных полипептидных фракций из спинного мозга быка (мкмоль на 1 мг белка)

Аминокислота	Содержание аминокислот во фракции	
	4а	4б
Лизин	0,31	0,76
Гистидин	0,37	0,32
NH ₃	3,2	0,23
Аргинин	0,9	0,14
Аспарагиновая кислота	0,7	1,09
Треонин	0,6	0,27
Серин	0,5	0,59
Глутаминовая кислота	1,0	0,47
Пролин	1,3	0,25
Глицин	1,4	0,71
Аланин	0,9	0,32
Валин	0,3	0,08
Метионин	0,1	0,013
Изолейцин	0,5	0,24
Лейцин	0,6	0,29
Тирозин	0,2	0,09
Фенилаланин	0,5	0,000

вотных. В настоящей работе, как указано в табл. 1, введение 100 мкг выделенных полипептидов (фракции 4а, 4б) или 1 мг тех же препаратов в смеси с полным адьювантом Фрейнда вызывало появление клинических признаков энцефаломиелита у 91% свинок (у 40 из 44); при введении препаратов в дозах 1—10 мкг типичный симптомокомплекс экспериментального аллергического энцефаломиелита был отмечен у 33% животных (у 4 из 12). Таким образом, выделенные в гомогенном виде полипептидные фракции обладали выраженной энцефалитогенной активностью, что согласуется с результатами исследований других авторов.

Т а б л и ц а 3

Реакции гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок, сенсibilизированных различными белковыми фракциями, выделенными из спинного мозга быка

Фракция	Доза сенсibilизирующего антигена, мг	Число обследованных животных	Число животных с полуживительными кожными пробами
3	1,0	18	14
	0,1	6	4
4	1,0	14	13
	0,1	20	14
4а	0,1	5	5
4б	1,0	8	5
	0,1	6	4

Т а б л и ц а 4

Комплементсвязывающие антитела в сыворотках морских свинок, сенсibilизированных различными белковыми фракциями, выделенными из спинного мозга быка

Фракция	Срок испытания сывороток, дни	Число исследованных сывороток	Число положительных сывороток	Титр комплементсвязывающих антител
3	10—35	54	0	—
4	10	17	1	1/10
	14—35	34	34	1/10—1/320
4а	10	5	1	1/10
	14—28	11	14	1/10—1/160
4б	10	4	1	1/10
	14—28	12	11	1/10—1/160

Данные по аминокислотному составу полипептидов фракций 4а и 4б указывают на резкие различия между ними в количественном отношении. Количественное содержание аминокислот этих фракций отличается также от аминокислотного состава полипептидов, выделенных другими авторами [9—11]. Вместе с тем наибольшее сходство в аминокислотном составе можно отметить между полипептидом фракции 4а и смесью основных белков белого вещества головного мозга крупного рогатого скота [12]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что энцефалитогенные свойства основных белков и полипептидов не зависят от способа получения препаратов, а детерминированы первичной структурой белка.

С этой точки зрения уместно остановиться на исследованиях последних лет по изучению структуры энцефалитогенных детерминант [1, 8, 13—16]. Так, при расщеплении пепсином основного белка из бычьего спинного мозга, состоящего из 142 аминокислотных остатков, было получено 2 пептида, обладающих более выраженными энцефалитогенными свойствами, чем исходный белок [13]. Пептид Е включал 16 остатков, пептид Е₁ — 26. На основании полученных данных авторы предполагают, что детерминанты, вызывающие энцефаломиелит, обусловлены специфической аминокислотной последовательностью и существенную роль в возникновении энцефаломиелита играет в частности N-концевая часть пептида, содержащая аргинин и триптофан [13]. Другими авторами при сравнительном анализе состава синтезированных энцефалитогенных полипептидов и их энцефалитогенной активности было обнаружено, что наиболее существенными при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита являются три аминокислоты — триптофан, глутамин и лизин. Обнаружено также, что аргинин может полностью заменить лизин в этой цепи [16]. В соответствии с приведенными выше данными выделенные нами полипептиды также содержали глутамин и лизин, однако при-

меншая методика кислотного гидролиза не позволила установить наличие в составе полипептидов триптофана, так как последний в кислой среде подвергается разрушению. Выделенные нами полипептиды фракций 4а и 4б также биологически были более активными по сравнению со смесью основных белков.

Подобно основным энцефалитогенным белкам или полипептидам, описанным в литературе [17—19], препараты, полученные нами, обладали антигенными свойствами, а именно все энцефалитогенные фракции стимулировали продукцию комплементсвязывающих антител, реагирующих перекрестно. Напротив, неэнцефалитогенная фракция была лишена способности вызывать антителообразование при введении животным.

Как энцефалитогенные, так и неэнцефалитогенная фракция вызывала развитие клеточных реакций гиперчувствительности замедленного типа у сенсibilизированных животных с отчетливой дифференцировкой специфичности препаратов той или другой группы. Так, не удалось выявить положительных кожных проб с энцефалитогенными белками (фракция 4) или полипептидами (фракции 4а, 4б) у животных, сенсibilизированных неэнцефалитогенной фракцией 3. У животных, сенсibilизированных энцефалитогенными препаратами кожные пробы были положительными лишь на энцефалитогенные фракции, но не на фракцию 3. Таким образом, в данных опытах получена фракция основного белка, которая, будучи неактивной в отношении способности индуцировать аллергический энцефаломиелит у морских свинок, вызывала развитие у последних реакции гиперчувствительности замедленного типа.

В настоящее время имеются сведения о том, что различные участки молекулы основного белка ответственны за индукцию аллергического энцефаломиелита и гиперчувствительности замедленного типа [20—23]. Представленные здесь данные о выделении основного белка, не способного вызывать энцефаломиелит, но обладающие свойством приводить к развитию реакции гиперчувствительности замедленного типа, согласуются с представлениями о возможности диссоциировать сенсibilизирующие и собственно энцефалитогенные свойства основных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bergstrand H. — «Immunochemistry», 1973, v. 10, p. 611—620. — 2. Carnegie P. R. — «Nature», 1971, v. 229, p. 27—30. — 3. Carnegie P. R., Benčina B., Lamoureux G. — «Biochem. J.», 1967, v. 105, p. 559—566. — 4. Eylar E. H. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1972, v. 195, p. 481—491. — 5. Иоффе В. И., Розенталь К. М. — «Ж. микробиол.», 1943, № 12, с. 65—69. — 6. Lumsden C. E., Robertson D. M., Blight R. — «J. Neurochem.», 1966, v. 13, p. 127—162. — 7. Oshiro Y., Eylar E. H. — «Arch. Biochem.», 1970, v. 138, p. 392—396. — 8. Eylar E. H., Salk J., Beveridge G. C. et al. — Ibid., 1969, v. 132, p. 34—48. — 9. Carnegie P. R., Lumsden C. E. — «Immunology», 1967, v. 12, p. 133—145. — 10. Hirshfeld H., Teitelbaum D., Arnon R. et al. — «Febs Letters.», 1970, v. 7, p. 317—320. — 11. Wolfgram F., Kottorii K. J. — «Neurochemistry», 1968, v. 15, p. 1281—1290. — 12. Палладин А. В., Герлецька Я. Т., Козулина О. П. — «Укр. біохім. ж.», 1970, № 2, с. 144—154. — 13. Eylar E. H., Hashim G. A. — «Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.», 1968, v. 61, p. 644—650. — 14. Suzuki K., Abiko T., Endo N. et al. — «Chem. pharm. Bull.», 1973, v. 21, p. 2627—2633. — 15. Swanborg R. U., Ames L. S. — «J. Immunol.», 1971, v. 107, p. 281—283. — 16. Westall F. C., Borinson A. B., Cassam J. et al. — «Nature», 1971, v. 229, p. 22—24. — 17. Lebar R., Voisin D. A. — «Int. Arch. Allergy», 1974, v. 46, p. 82—103. — 18. Lebar R., Boutry G. - M., Rovineaux R. et al. — «C. R. Acad. Sci. (Paris)», 1973, v. 276-D, p. 1635—1638. — 19. Lisak R. P., Zweiman B., Kies M. W. et al. — «J. Immunol.», 1975, v. 114, p. 546—549. — 20. Hashim G. A., Sharpe R. D. — «Immunology», 1974, v. 11, p. 633—640. — 21. Idem. — «Nature», 1975, v. 255, p. 484—485. — 22. Hashim G. A., Hwang F., Schilling F. H. — «Arch. Biochem.», 1973, v. 156, p. 298—309. — 23. Teitelbaum D., Webb C., Arnon R. et al. — «Israel J. med. Sci.», 1975, v. 11, p. 1389.

Поступила 20/1 1977 г.

ISOLATION AND STUDY OF ENCEPHALITOGENIC PROTEIN FRACTIONS FROM MEDULLA SPINALIS

Yu. L. Zhitnukhin, V. M. Pleskov

Department of Microbiology and Immunology, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Main encephalitogenic protein was isolated from bovine medulla spinalis and separated into homogenous polypeptide fractions by gel filtration; some of these fractions had the high encephalitogenic activity. The main protein and its fractions, possessing the encephalitogenic activity, caused a development of cross-reacting antibodies and a sensitization to intracutaneous administration of encephalitogenic preparations in animals. Non-encephalitogenic main protein sensitized animals only to this protein and did not induce the formation of distinct amount of antibodies. The amino acid composition of the encephalitogenic polypeptide is exhibited.

УДК 612.349.7.015.348-1-616.379-008.64-092.9-008.939.6

В. К. Огнева, В. С. Репин, В. А. Чернявский

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО СОСТАВА И СИНТЕЗ БЕЛКА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ОСТРОВКАХ ЛАНГЕРГАНСА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Кафедра анатомии, гистологии и эмбриологии медицинского факультета Медицинской академии, София, лаборатория цитологии и лаборатория памяти Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

В островках Лангерганса (ОЛ) идентифицированы белковые фракции с постоянными электрофоретическими характеристиками. Белковый состав одиночных ОЛ, выделенных из поджелудочной железы крыс с аллоксановым диабетом, существенно изменяется практически полностью исчезают фракции «константных» белков, уменьшается общее количество идентифицируемых фракций. Валовая белоксинтезирующая активность ОЛ, выделенных от диабетических животных, снижена в 3—4 раза по сравнению с интенсивностью синтеза белка в ОЛ контрольных животных. Обнаружен эффект «глюкозной репрессии» синтеза белка в изолированных ОЛ.

В общей последовательности реакций биосинтеза, накопления и секреции инсулина В-клетками пока идентифицированы лишь некоторые энзиматические их этапы, являющиеся объектом интенсивного экспериментального изучения. Показано, что образование активного гормона в В-клетках из проинсулина происходит с помощью специальной протеиназы [1]. Установлено, что глюкоза является мощным индуктором секреции (эмиоцитоза) инсулина и эта реакция контролируется уровнем цАМФ [2, 3]. Однако остается неизвестной природа факторов, регулирующих сопряжение биосинтеза проинсулина с его превращением в активный гормон, секретируемый гранулами. Исследование этого представляет особый интерес в связи с изучением первичного молекулярного механизма действия диабетогенных факторов, в том числе аллоксана.

Прямые биохимические исследования долгое время были ограничены микроскопическими размерами островков Лангерганса (ОЛ). Большинство исследований было выполнено на целой поджелудочной железе с использованием гистохимических, автордиографических и цитоспектрофотометрических методов [4, 5]. Часть работ была проведена при помощи микробиохимических методов на тотальной очищенной фракции ОЛ, полученных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, при этом экзокринную часть железы удаляли предварительным самоперевариванием [6, 7].

В данном исследовании предпринята попытка использовать чувствительные микробиохимические методы для изучения белкового состава и синтеза белка в изолированных ОЛ. Были поставлены следующие задачи: выявить гомологию и признаки полиморфизма по классам белков, определяемых в одиночных ОЛ одной железы; исследовать изменения белкового состава ОЛ у животных с аллоксановым диабетом; исследовать механизм «глюкозной репрессии» синтеза белка в изолированных ОЛ.

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 300—400 г. Животных декапитировали, извлекали поджелудочную железу и на холоду производили выделение ОЛ под контролем лупы МБС-2 по методу Хеллерстрема [8] (рис. 1, см. вклейку). Изолированные ОЛ помещали в 2—3 мл холодной среды 199 (приготовленной на среде Хэнкса). После двукратной смены среды ОЛ для гомогенизации переносили в микрогомогенизатор с внутренним диаметром 0,9 мм, в который добавляли 0,8 мл лизирующей среды (1% тритон X-100 — 20% сахара — 0,06 М трис-HCl-буфер pH 6,7). Гомогенизацию проводили с помощью стальной иглы, вращающейся со скоростью 3000 об/мин в течение 2—3 мин. Микрогомогенат центрифугировали в течение 30 мин при 12 000 g, супернатант количественно отбирали микропипеткой и подвергали биохимическому исследованию. Приготовление гомогената ОЛ в большом количестве для радиохимических экспериментов производили тем же способом. Экспериментальный диабет вызывали внутрибрюшинным введением самцам крыс 180 мг/кг аллоксана (фирма «Сигма», США). Через 14 дней после введения аллоксана отбирали животных с выраженной гипергликемией (415—486 мг% сахаров, определенных ортодианизидиновым методом). Все процедуры извлечения, манипуляции и анализа ОЛ производили, как и в контрольной группе животных. Солюбилизованные белки гомогената одиночных ОЛ разделяли методом диск-электрофореза в капиллярах в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ), как описано ранее [9, 10]. Сканирование окрашенных гелей осуществляли на двухцветном микроденситометре экспериментальных мастерских Научно-исследовательского института органической химии Сибирского отделения АН СССР (НИИОХ СО АН СССР). Белки в геле разделяли на 9 мм по анионному фронту, маркированному бром-феноловым синим. Относительную подвижность белков рассчитывали к подвижности бром-фенолового синего.

Микрогель-хроматографию белков гомогената ОЛ проводили на колонке сефадекса G-75 120×1,3 мм ($V_0=70$ мл, $V_t=190$ мл). Калибровку колонки производили с помощью голубого декстрана (молекулярный вес 2×10^6 дальтон), альбумина (68 000), лизоцима (17 500), цитохрома с (12 700) и АМФ. Подачу 0,06 М трис-HCl-элюирующего буфера осуществляли микрошприцем со скоростью 2 мл/мин. Объем элюируемых фракций составлял 10 мл. Оптическую плотность элюата регистрировали с помощью капиллярного двухволнового микроспектрофотометра (мастерские НИИОХ СО АН СССР), соединенного с самописцем КСП-4. Определение радиоактивности проб производили на счетчике «Nuclear Chicago» по методу наружной стандартизации, используя толуольный сцинтиллятор (5 г PPO, 200 мг POPOP, 300 мл этанола на 1 л толуола). Эффективность счета составляла 60%.

Результаты и обсуждение

Типичная картина разделения белков гомогената одного ОЛ поджелудочной железы крыс представлена на рис. 2. Удалось идентифицировать 15 важнейших групп белков ОЛ с постоянной подвижностью (в скобках указана частота появления фракций в опытах): А — $0,058 \pm 0,004$ (80), Б — $0,126 \pm 0,008$ (73), В — $0,23 \pm 0,02$ (33), Г — $0,305 \pm 0,009$ (40), Д — $0,36 \pm 0,01$ (27), Е — $0,41 \pm 0,01$ (73), Ж₁ — 0,444 (27), Ж₂ — $0,47 \pm 0,01$ (33), З — $0,515 \pm 0,009$ (67), И — $0,57 \pm 0,02$ (53), К — $0,637 \pm 0,009$ (33), Л₁ — 0,666 (20), Л₂ — $0,738 \pm 0,008$ (47), М — $0,80 \pm 0,01$ (93), Н — $0,912 \pm 0,03$ (67). С помощью коммерческого маркерного инсулина (фирма «Сигма», США) удалось установить, что фракция М имеет подвижность очищенного гормона. В индивидуальных ОЛ эта фракция составляет 0,03—0,04% всех солюбилизованных белков ОЛ.

Наряду с «константными» фракциями белков ОЛ обнаружены дополнительные фракции белков с непостоянной подвижностью, состав и количество которых менялись от эксперимента к эксперименту.

Проведя эту серию опытов, удалось сделать следующие выводы: значительная часть белков ОЛ представлена гомологичными классами; биохимический полиморфизм ОЛ проявляется в индивидуальных классах белков, имеющих не универсальную, а региональную локализацию, различным количественным содержанием инсулина в ОЛ и различным относительным содержанием «константных» белков.

Известно, что в составе ОЛ диаметром 250—300 мкм (изолированных в наших опытах) содержится порядка 100—150 клеток, причем 75% всех клеток ОЛ составляют В-клетки, секретирующие инсулин. Относительное содержание А-, С- и Д-клеток в ОЛ точно неизвестно, однако их общее количество не превышает 30% всей клеточной популяции [6, 7], поэтому

есть некоторые основания предполагать, что преобладающие классы — классы белков — одиночных ОЛ являются конститутивными белками В-клеток. Однако до сих пор не существует общепринятых методов выделения индивидуальных клонов эндокринных клеток ОЛ, и мы не смогли

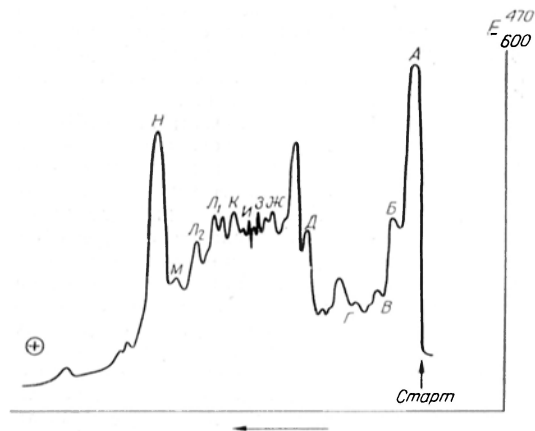


Рис. 2. Денситограмма солюбилизованных белков одного ОЛ, фракционированных в 7,5% ПААГ.

По оси абсцисс стрелкой указано направление сканирования; по оси ординат — оптическая плотность фракций в максимуме поглощения амидо черного. Буквами обозначены фракции белков с постоянной анодной подвижностью.

подвергнуть прямой экспериментальной проверке это предположение, поэтому в следующей серии опытов мы изучили белковый состав одиночных ОЛ у крыс с вызванным экспериментальным диабетом. Мы исходили из предположения, что селективное повреждение В-клеток аллоксаном должно сопровождаться характерными изменениями в химическом составе инсулярного аппарата поджелудочной железы. Действительно, во всех опытах наблюдали выраженные изменения в составе белков ОЛ у крыс с индуцированным диабетом. Суммарное количество белка и общее количество четко идентифицируемых фракций значительно снижаются, причем преобладающая часть «константных» белков пол-

ностью исчезает, а некоторые из них определяются лишь в отдельных опытах (см. таблицу). Наиболее выраженные изменения в спектре белков наблюдали в области с максимальной анодной подвижностью: преобладающая часть белков, включая фракцию инсулина, полностью исчезала в

Фракции белков одиночных ОЛ, идентифицированные при помощи микродиск-электрофореза в 7,5% ПААГ, у крыс с аллоксановым диабетом

№ опыта	Подвижность белков по отношению к бром-феноловому синему											
	%											
1	0,033			0,377	0,40		0,522					
	0,077				0,411		0,555					
2	0,055		0,288			0,477		0,6				
3	0,033		0,277					0,622		0,822		
4	0,033	0,127	0,200				0,500	0,566	0,655	0,844	0,922	
			0,222						0,677			
5	0,033	0,155		0,244		0,477		0,577	0,666		0,888	
	0,088											
6	0,044			0,333							0,911	
											0,977	
7	0,033	0,122	0,188	0,288	0,377	0,477						
8	0,033	0,188										
9	0,033	0,188		0,233	0,355	0,444	0,522					
10	0,033			0,222	0,344		0,488					
11	0,444				0,311		0,355	0,455				
12	0,033	0,11		0,277			0,4	0,5	0,544			
13	0,033			0,255			0,366	0,444				

ОЛ. Проведенные эксперименты показали, что аллоксановый диабет у крыс вызывает значительные изменения белкового состава ОЛ и резкое уменьшение белкового спектра ОЛ, которое, вероятно, указывает на снижение белоксинтезирующей активности клеток.

К ст. В. К. Огневой и др.

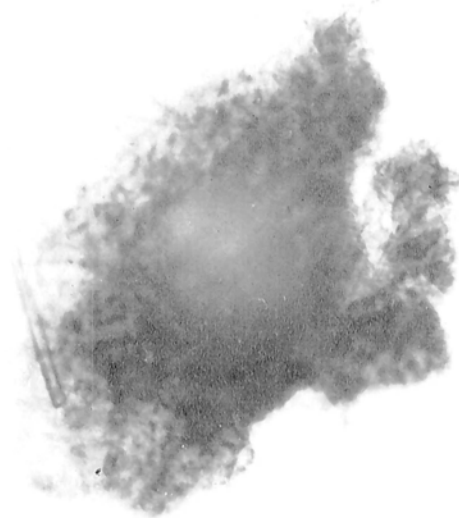


Рис. 1. Одиночный ОЛ поджелудочной железы крысы, выделенный при помощи микродиссекции. Ув. $\times 80$.

К ст. А. В. Попова и др.

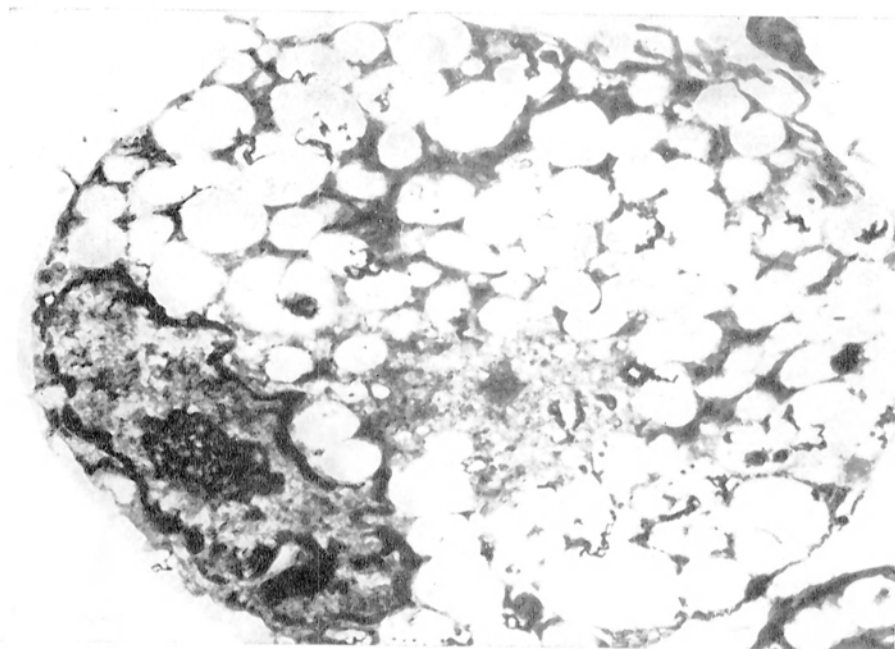


Рис. 1. Электронная автораддиография пенной клетки, выделенной из аорты кролика после перфузии ее средой, содержащей радиоактивные липопротеиды. Распределение метки преимущественно связано с липидными вакуолями. Ув. $8000\times$.

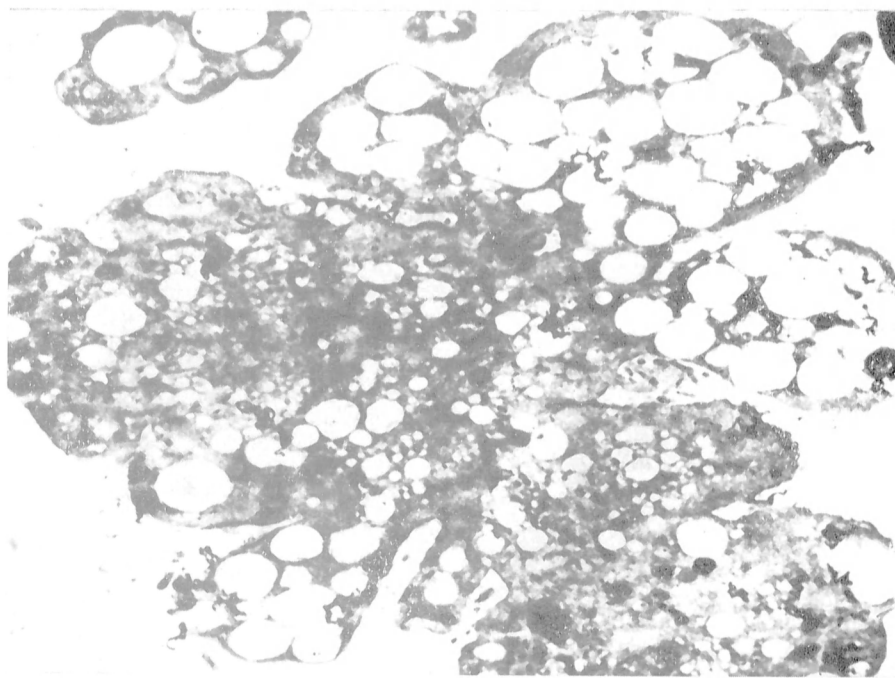


Рис. 2. Переходная стадия трансформации гладкомышечной клетки в пенистую клетку. Характерная лопастная форма клетки с многочисленными лакунами, в которых прослеживаются структуры базальной мембраны. Количество вакуолей меньше, чем в зрелой пенистой клетке. Распределение метки также связано с липидными вакуолями. Ув. 8000X.

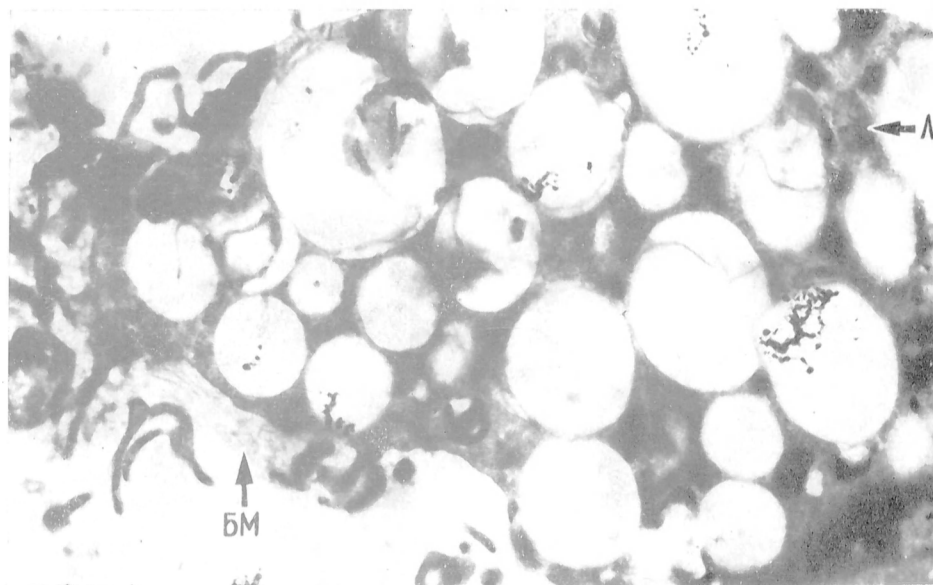


Рис. 3. Фрагмент пенистой клетки гладкомышечного происхождения. Видны остатки базальной мембраны (БМ — стрелка). Гранулы восстановленного серебра над липидными вакуолями, над лизосомой (Л — стрелка). Ув. 30 000X.

Последнее предположение мы попытались проверить в следующей серии опытов, изучая белоксинтезирующую активность изолированных ОЛ интактных крыс и животных с диабетом (приготовленной на растворе Хэнкса).

Тридцать пять свежевыделенных ОЛ помещали в 1 мл среды № 199, содержащей 10 мкКи ^3H -d, l-лейцина с удельной радиоактивностью 77 мКи/ммоль, и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. После инкуба-

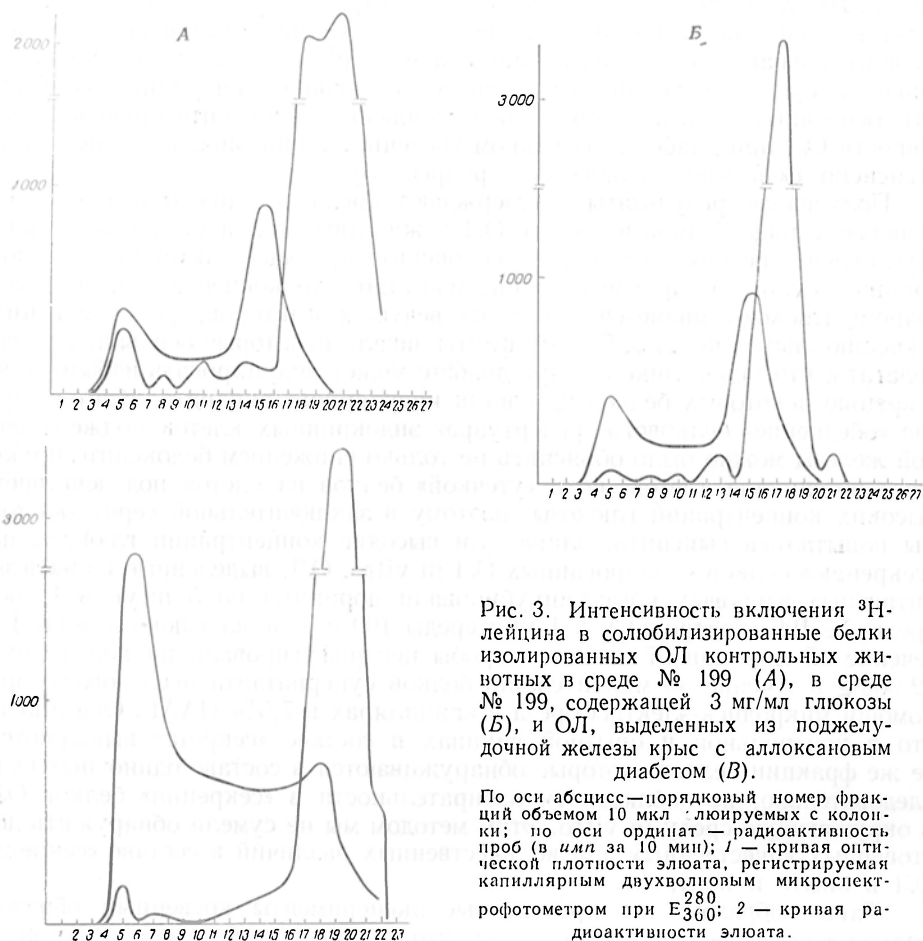


Рис. 3. Интенсивность включения ^3H -лейцина в солюбилизованные белки изолированных ОЛ контрольных животных в среде № 199 (А), в среде № 199, содержащей 3 мг/мл глюкозы (Б), и ОЛ, выделенных из поджелудочной железы крыс с аллоксановым диабетом (В).

По оси абсцисс — порядковый номер фракций объемом 10 мкл, элюируемых с колонки; по оси ординат — радиоактивность проб (в имп за 10 мин); 1 — кривая оптической плотности элюата, регистрируемая капиллярным двухволновым микроспектрофотометром при E_{280} ; 2 — кривая радиоактивности элюата.

ции ОЛ дважды переносили в свежую среду, затем в специальный микрогомогенизатор, куда добавляли 1 мкл лизирующей смеси (1% тритон Х-100 — 20% сахара — 0,06 М грис-НСI-буфер рН 6,7). Гомогенизацию ткани производили описанным выше способом. Гомогенат центрифугировали при 12 000 g в течение 30 мин, супернатант отбирали микропипеткой и наносили для хроматографии на колонку сефадекса G-75.

Оказалось, что изолированные ОЛ нормальных животных обладают высокой белоксинтезирующей активностью: около 7% внутриклеточного фонда меченой аминокислоты обнаруживается в белках после инкубации в течение 1 ч в среде № 199 при 37°C (рис. 3, А). Максимальная интенсивность включения ^3H -лейцина наблюдалась во фракции высокомолекулярных белков, выходящих в наружном объеме колонки, а также во фракции с молекулярным весом 30 000, 13 000 и 6000—7000 (фракция инсулина). Заловая интенсивность включения ^3H -лейцина в белки ОЛ, выделенных из железы животных с аллоксановым диабетом, была снижена в 3—4 раза, причем пик отчетливого включения метки был обнаружен лишь во

фракции низкомолекулярных белков (рис. 3, Б). Поскольку функционирование инсулярного аппарата у животных с аллоксановым диабетом происходило в условиях длительной гипергликемии, можно было предполагать, что наблюдаемые изменения белоксинтезирующей активности ОЛ обусловлены «глюкозной репрессией» [3, 11]. Действительно, мы отмечали частичное подавление белоксинтезирующей активности изолированных «нормальных» ОЛ в среде № 199, содержащей 3 мг/мл глюкозы (рис. 3, Б). Характерно, что высокая концентрация глюкозы в среде приводит к преимущественному подавлению включения метки в высокомолекулярную фракцию и значительно слабее тормозит включение метки в низкомолекулярные белки (в том числе во фракцию инсулина), поэтому есть основания полагать, что резкое снижение белоксинтезирующей активности ОЛ при диабете, вызванном введением аллоксана, не может быть объяснено феноменом «глюкозной репрессии».

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что исчезновение ряда белков в составе ОЛ у животных с диабетом может быть обусловлено резким снижением белоксинтезирующей активности эндокринных клеток. С другой стороны, известно, что концентрация «внеклеточной» глюкозы является одним из ведущих факторов, регулирующих секрецию инсулина [2, 3, 7]. Эти факты давали некоторые основания предполагать, что гипергликемия при диабете может индуцировать избыточную секрецию некоторых белков из клеток инсулярного аппарата. В этом случае «обеднение» белкового «репертуара» эндокринных клеток поджелудочной железы можно было объяснить не только снижением белоксинтезирующего потенциала клеток, но и «утечкой» белков из клеток под действием высоких концентраций глюкозы, поэтому в заключительной серии опытов мы попытались выяснить, влияют ли высокие концентрации глюкозы на «секрецию» белков изолированных ОЛ *in vitro*. ОЛ, выделенные из железы intactных здоровых крыс, инкубировали порциями по 5 штук в 1 мкл среды № 199 (контроль) и в 1 мкл среды 199 с 3 мг/мл глюкозы (опыт) в течение 45 мин при 37°C. Затем пробы центрифугировали на холоду при 12 000 g в течение 30 мин и состав белков супернатанта исследовали при помощи микродиск-электрофореза в капиллярах в 7,5% ПААГ. Оказалось, что в контрольной и опытной группах в составе «секрета» выявляются те же фракции белков, которые обнаруживаются в составе одиночных ОЛ, следовательно, не наблюдается избирательности в «секреции» белков ОЛ в окружающую среду *in vitro*. Этим методом мы не сумели обнаружить достоверных качественных или количественных различий в составе «секрета» ОЛ в опыте и контроле.

Таким образом, все проведенные эксперименты косвенным образом подтверждают предположение о том, что не «утечка» белков из клеток, а другие факторы могут быть причиной стабильных изменений белкового состава ОЛ при диабете. Нет оснований думать, что последние обусловлены изменением клеточного состава ОЛ, поскольку дозы аллоксана, вызывающие диабет, оказывают лишь слабое цитотоксическое действие [6, 12]. В то же время однократное введение аллоксана приводит к стабильным нарушениям эндокринных функций и состава белков всех исследованных ОЛ. Такие устойчивые модификации биохимического фенотипа и функций ОЛ, вызванные аллоксаном, возможно, имеют эпигенетическую природу [13]. На фон первичной репрессии синтеза белков в ОЛ, вызванной аллоксаном, в дальнейшем накладываются вторичные дефекты синтеза белков, вызванные гипергликемией (по механизму «глюкозного эффекта»). Известно, что высокие концентрации глюкозы в бактериях и гепатоцитах приводят к снижению содержания цАМФ [3, 14], тогда как те же концентрации глюкозы вызывают активацию аденилатциклазы и повышение уровня цАМФ в ОЛ [11], поэтому высказано предположение, что торможение синтеза белков вызывается не глюкозой, а некоторыми промежуточными продуктами гликолитического цикла [11].

Полученные данные показывают, что аллоксан не является, по-видимому, селективным ингибитором новообразования или секреции инсулина, однако этот диабетогенный агент вызывает резкое снижение белок-синтезирующей активности клеток ОЛ. Эти факты не подтверждают общепринятой гипотезы, предполагающей первичное нарушение секреции (эммоцитоза) инсулина В-клетками при различных формах инсулинопатий [2, 3]. Возможно, что обнаруженный нами тип нарушений в ОЛ характерен лишь для экспериментального диабета, вызванного аллоксаном, и существует несколько механизмов устойчивого нарушения функционирования В-клеток в ОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tager H. S., Em̄din S. O., Clark J. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1973, v. 248, p. 3476—3482. — 2. Cerasi E. — «Quar. Rev. Biophys.», 1975, v. 8, p. 1—41. — 3. Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. — «Science», 1973, v. 174, p. 142—144. — 4. Bowen V., Lazarus N. R. — «Biochem. J.», 1974, v. 142, p. 385—389. — 5. Hahn H. J., Hellman N., Lernmark A. et al. — «Acta biol. med. germ.», 1974, v. 32, p. 375—383. — 6. Ostman J., Milner R. D. G. Diabetes. Amsterdam, 1969. — 7. Falkman S., Hellman B., Taljedal J. B. The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets. Oxford, 1970. — 8. Hellerstrom C. — «Acta endocr. (Kbh.)», 1964, v. 75, p. 122—123. — 9. Репин В. С., Акимова И. М. — «Онтогенез», 1975, № 3, с. 219—225. — 10. Репин В. С., Акимова И. М., Теровский В. Б. — «Бюлл. exper. биол.», 1974, № 7, с. 50—52. — 11. Grill V., Cerasi E. — «FEBS Letters», 1973, v. 33, p. 311—314. — 12. Wellman K. F., Bruno W., Lazarus S. S. — «Diabetes», 1967, v. 16, p. 242—251. — 13. Оленов Ю. М. «Цитология», 1975, № 10, с. 119—1124. — 14. Butcher R. W., Robinson G. A., Hardman J. G., et al. — «Adv. Enzyme Regulat.», 1968, v. 6, p. 357—389.

Поступила 22/X 1976 г.

CHARACTERISTICS OF PROTEIN COMPOSITION AND OF ITS SYNTHESIS IN ISOLATED PANCREATIC LANGERHANS' ISLANDS OF RATS IN NORMAL STATE AND WITH ALLOXAN DIABETES

V. K. Ogneva, V. S. Repin, V. A. Chernyavsky

Chair of Anatomy, Histology and Embryology, Medical Faculty, Medical Academy, Sofia, Bulgaria, Laboratory of Cytology, Laboratory of Memory, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Protein fractions with dissimilar electrophoretic mobility were identified in Langerhans' islands. In solitary islands, isolated from pancreas of rats with alloxan diabetes as compared with normal rats the protein composition varied distinctly: fractions of «constant» proteins and, specifically, the insulin fraction disappeared completely, total amount of identified fractions was decreased with relative alteration in their mobility. The total protein-synthesizing activity of Langerhans' islands from diabetic animals was 3-4-fold decreased as compared with that of control animals. An effect of «glucose repression» of protein synthesis was observed in isolated Langerhans' islands.

УДК 612.332.7.015.641.1+612.332.7.015.641.5

А. Г. Кирилюк, Ю. В. Хмелевский

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИТАМИНОВ В₁ И РР ПРИ ВСАСЫВАНИИ В КИШЕЧНИКЕ КРЫС

Кафедра биохимии Киевского медицинского института

Взаимоотношения между тиамином и никотиновой кислотой при их всасывании в тонком кишечнике зависят от количественного соотношения витаминов в просвете кишечника. Большие концентрации никотиновой кислоты ($40 \cdot 10^{-3}$ М) снижали скорость всасывания тиамин и ингибировали активность тиаминпирифосфатазы в клетках слизистой оболочки кишечника. Большие концентрации тиамин ($3,1 \cdot 10^{-3}$ М) уменьшали абсорбцию ^{14}C -никотиновой кислоты. При совместном всасывании ^{14}C -никотиновой кислоты и тиамин в клетках слизистой оболочки кишечника не определялся никотинамид, который был обнаружен при всасывании одной ^{14}C -никотиновой кислоты.

В настоящее время витамины в лечебной практике применяются без достаточного учета процессов их всасывания в кишечнике. Между тем известны данные, указывающие на возможность угнетения всасывания одного витамина при пероральном введении большого количества другого [1]. В ряде случаев установлена зависимость всасывания витаминов от соотношения их количества, поступающего в кишечник.

Учитывая широкое применение витаминов B_1 и РР в качестве лечебных препаратов, мы изучали механизмы их взаимодействий при всасывании в тонком кишечнике крыс в условиях различных соотношений тиамин и никотиновой кислоты. Наряду с исследованием взаимовлияния тиамин и никотиновой кислоты на их всасывание в кишечнике мы изучали взаимодействие этих витаминов на этапе транспорта в клетки кишечника и на уровне трансэнтероцитарного переноса. С этой целью мы определяли влияние никотиновой кислоты на активность кишечной тиаминпирофосфатазы (КФ 3.6.1.6) [2], а также влияние тиамин на метаболизм никотиновой кислоты в клетках кишечника при ее всасывании [3].

Методика

Опыты были поставлены на белых крысах-самцах массой 185 ± 15 г, содержавшихся на стандартном рационе вивария. Перед экспериментами животные не получали пищи в течение 4 ч. Всасывание тиамин в кишечнике изучали методом перфузии изолированного отрезка кишечника [2]. Тиамин в перфузате определяли флуориметрическим методом [4]. Активность тиаминпирофосфатазы в кишечной стенке при всасывании тиамин исследовали сразу же после перфузии кишечника гистохимическим методом [5]. Транспорт тиамин и никотиновой кислоты в клетки кишечника изучали на изолированных препаратах кишечника крыс, взятых на уровне верхней трети тонкого кишечника. Инкубационной средой служил раствор Тироде рН 7,4, насыщенный кислородом. Продолжительность инкубации 10 мин при 37°C . Всасывание витамина РР определяли по степени исчезновения ^{14}C -никотиновой кислоты, вводимой в изолированный отрезок тонкого кишечника крыс на уровне его верхней трети. В отрезок кишечника вводили 1 мл раствора, содержащего 10 мкг ^{14}C -никотиновой кислоты в концентрации $40 \cdot 10^{-6}$ М. Через 10 мин после введения витамина исследовали радиоактивность в люминальном содержимом и накопление метки в слизистой оболочке кишечника. Метаболиты ^{14}C -никотиновой кислоты в слизистой оболочке кишечника определяли методом нисходящей хроматографии на бумаге в системе бутанол — вода (80 : 20) [6]. Профиль активности на хроматограммах, указывающий на распределение метаболитов ^{14}C -никотиновой кислоты, получали после определения радиоактивности по всей полосе бумажной хроматограммы. Радиоактивность проб измеряли на торцевом счетчике и пересчетном приборе ПСТ-100 и выражали в импульсах на 1 г ткани в 1 мин. Результаты экспериментов обрабатывали биометрически [7].

Результаты и обсуждение

За 10 мин перфузии отрезка кишечника раствором, содержащим тиамин в концентрации $3,1 \cdot 10^{-6}$ М, из 7,5 мкг тиамин всосалось 67% общего количества витамина, прошедшего через отрезок кишечника (рис. 1). Присутствие никотиновой кислоты в перфузате в концентрации $40 \cdot 10^{-6}$ М увеличивало абсорбцию тиамин из перфузата на 6% ($P=0,05$). Добавление в перфузат никотиновой кислоты в концентрации $40 \cdot 10^{-3}$ М снижало всасывание тиамин на 8% ($P < 0,05$).

Изучение влияния витамина РР на скорость всасывания тиамин из перфузата показало (рис. 2), что никотиновая кислота, присутствовавшая в перфузате в концентрации $40 \cdot 10^{-6}$ М, способствовала увеличению скорости всасывания тиамин в течение первых 4 мин перфузии ($P < 0,05$). Увеличение концентрации никотиновой кислоты в перфузате до $40 \cdot 10^{-3}$ М приводило к снижению скорости всасывания тиамин из перфузата, также особенно заметно на первых минутах перфузии ($P < 0,01$). Можно предположить, что разница в скорости всасывания тиамин на первых минутах перфузии в присутствии различного количества никотиновой кислоты вызывается различие в общем количестве всосавшегося за 10 мин тиамин.

Учитывая значительную роль тиаминпирофосфатазы кишечника в процессе всасывания тиамин [2], мы изучили ее активность при всасы-

вании тиамин и различного количества никотиновой кислоты. Обнаружено, что при совместном всасывании тиамин в концентрации $3,1 \cdot 10^{-6}$ М и никотиновой кислоты в концентрации $40 \cdot 10^{-6}$ М активность тиаминпирофосфатазы в кишечной стенке не изменялась по сравнению с контролем. Увеличение концентрации никотиновой кислоты в перфузате до $40 \cdot 10^{-3}$ М вызывало резкое ингибирование активности тиаминпирофосфатазы в клетках слизистой оболочки кишечника и в его стенке (рис. 3).

Таким образом, большие количества никотиновой кислоты, присутствовавшие вместе с тиамином в перфузате, оказывали ингибирующее влияние на активность тиаминпирофосфатазы, что могло приводить к изменению метаболизма тиаминфосфатов, образующихся при всасывании свободного тиамин на уровне клеток слизистой оболочки кишечника [2, 8].

В опытах *in vitro* на моделях «вывернутых мешочков» из препаратов тонкого кишечника мы исследовали влияние никотиновой кислоты на транспорт тиамин в клетки слизистой оболочки кишечника. Результаты этих опытов представлены в табл. 1. Никотиновая кислота, присутствовавшая в инкубационном растворе в концентрации $40 \cdot 10^{-6}$ М, не оказывала влияния на поглощение тиамин клетками слизистой оболочки кишечника. Увеличение концентрации никотиновой кислоты в инкубационной среде до $3,1 \cdot 10^{-3}$ М приводило к снижению транспорта тиамин в клетки слизистой оболочки кишечника ($P < 0,01$).

В следующей серии экспериментов мы исследовали влияние различного количества тиамин на всасывание никотиновой кислоты в кишечнике крыс в опытах *in situ*. Совместное введение в изолированный отрезок тонкого кишечника крыс никотиновой кислоты в концентрации $40 \cdot 10^{-6}$ М и тиамин в концентрации $3,1 \cdot 10^{-6}$ М практически не влияло на скорость исчезновения ^{14}C -никотиновой кислоты из люминального содержимого (рис. 4). За 10 мин всасывалось в среднем 30% никотиновой кислоты из содержимого отрезка кишечника. При концентрации тиамин в просвете кишечника, равной $3,1 \cdot 10^{-3}$ М, всасывание никотиновой кислоты за 10 мин несколько снижалось ($P = 0,05$).

Через 10 мин после введения раствора ^{14}C -никотиновой кислоты в изолированный отрезок кишечника крыс основной фонд метки (70,9%) в клетках слизистой оболочки кишечника был представлен никотинамидом и только 27% — никотиновой кислотой (рис. 5). При совместном всасывании никотиновой кислоты в концентрации $40 \cdot 10^{-6}$ М и тиамин в концентрации $3,1 \cdot 10^{-6}$ М метка в слизистой оболочке кишечника входила

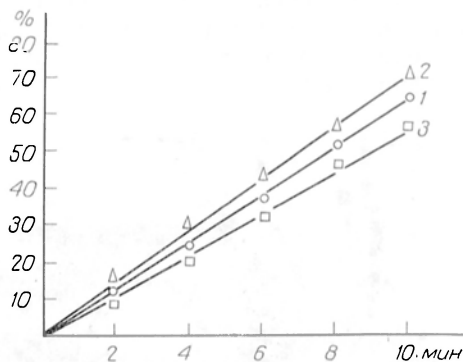


Рис. 1. Всасывание тиамин в отрезке тонкого кишечника крыс.

Концентрация витаминов в перфузате: 1— $3,1 \cdot 10^{-6}$ М тиамин; 2— $3,1 \cdot 10^{-6}$ М тиамин и $40 \cdot 10^{-6}$ М никотиновой кислоты; 3— $3,1 \cdot 10^{-6}$ М тиамин и $40 \cdot 10^{-3}$ М никотиновой кислоты.

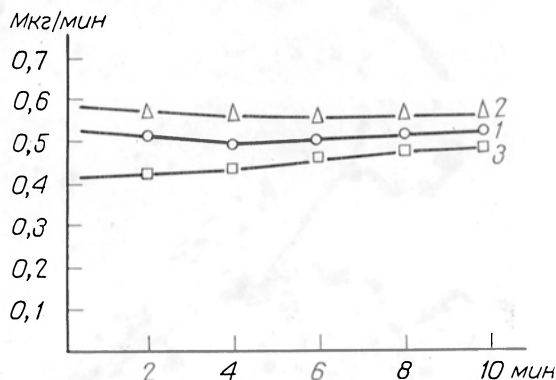


Рис. 2. Скорость всасывания тиамин в отрезке тонкого кишечника крыс.

Обозначения те же, что на рис. 1.

преимущественно в состав никотиновой кислоты (до 98%). При увеличении концентрации тиамина в люминальном растворе до $3,1 \cdot 10^{-3}$ М 61% метки был идентифицирован в составе никотиновой кислоты и 23% — в составе никотинамида.

Таким образом, различное количество тиамина при совместном всасывании с никотиновой кислотой оказывало определенное влияние на метаболизм поступающей в клетки слизистой оболочки кишечника никотиновой кислоты.

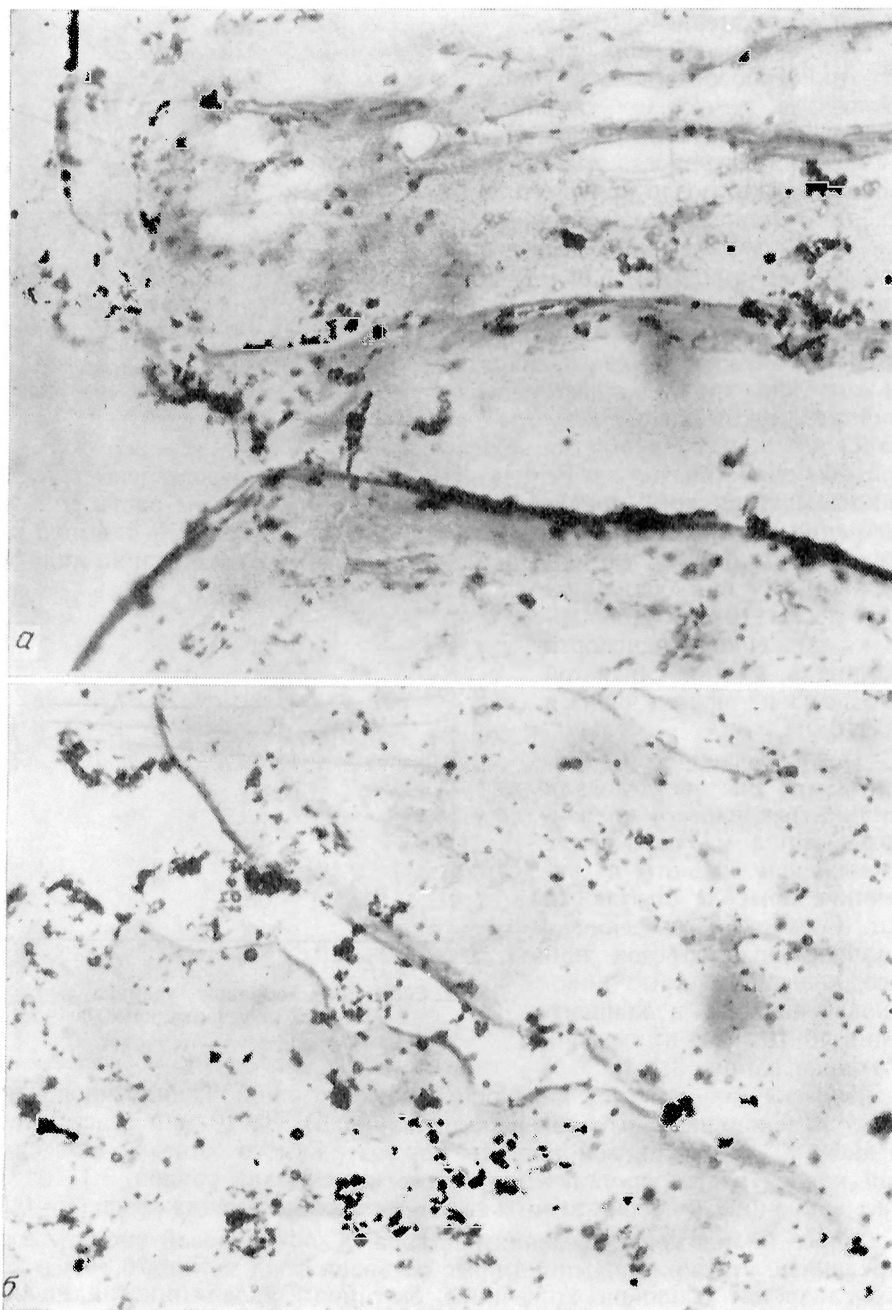


Рис. 3. Активность тиаминапирофосфатазы в стенке тонкого кишечника крыс.
А — $3,1 \cdot 10^{-6}$ М тиамина; Б — $3,1 \cdot 10^{-6}$ М тиамина и $40 \cdot 10^{-5}$ М никотиновой кислоты.

В экспериментах *in vitro* мы изучили транспорт меченой ^{14}C -никотиновой кислоты в изолированные сегменты из тонкого кишечника крыс, взятые на уровне верхней трети кишечника, и влияние различных количеств тиамина на транспорт никотиновой кислоты в клетки кишечника. Результаты исследований, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что в данных условиях эксперимента не было обнаружено влияния тиамина на транспорт ^{14}C -никотиновой кислоты в клетки кишечника.

Т а б л и ц а 1

Транспорт тиамина в клетки слизистой оболочки кишечника крыс ($M \pm m$)		
Концентрация в инкубационной среде, М		Накопление тиамина в клетках слизистой оболочки, мкг на 1 г ткани
тиамина	никотиновой кислоты	
$3,1 \cdot 10^{-6}$	—	$0,285 \pm 0,032$
$3,1 \cdot 10^{-6}$	$40 \cdot 10^{-6}$	$0,278 \pm 0,036$
$3,1 \cdot 10^{-6}$	$40 \cdot 10^{-3}$	$0,167 \pm 0,020$

Т а б л и ц а 2

Транспорт ^{14}C -никотиновой кислоты в изолированные сегменты тонкого кишечника крыс		
Концентрация в инкубационной среде, М		Накопление метки в сегментах кишечника, имп/мин/г
^{14}C -никотиновой кислоты	тиамина	
$40 \cdot 10^{-6}$	—	487 ± 25
$40 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$	431 ± 66
$40 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	451 ± 30

Проведенное изучение взаимодействия витаминов B_1 и РР на уровне всасывания в кишечнике раскрывает роль ряда механизмов, лежащих в основе взаимодействия этих витаминов. Как следует из результатов экспериментов *in situ*, большие дозы одного из витаминов, присутствующие в люминальном содержимом, имеют выраженную тенденцию ингибировать всасывание витамина, присутствующего в небольших, физиологических, количествах в просвете кишечника. Некоторые авторы связывали причину такого антагонизма с конкурен-

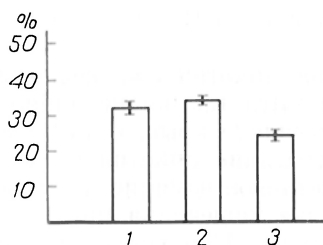


Рис. 4. Всасывание ^{14}C -никотиновой кислоты в изолированном отрезке тонкого кишечника крыс за 10 мин. 1— $40 \cdot 10^{-6}$ М ^{14}C -никотиновой кислоты; 2— $40 \cdot 10^{-6}$ М ^{14}C -никотиновой кислоты и $3,1 \cdot 10^{-6}$ М тиамина; 3— $40 \cdot 10^{-6}$ М ^{14}C -никотиновой кислоты и $3,1 \cdot 10^{-3}$ М тиамина.

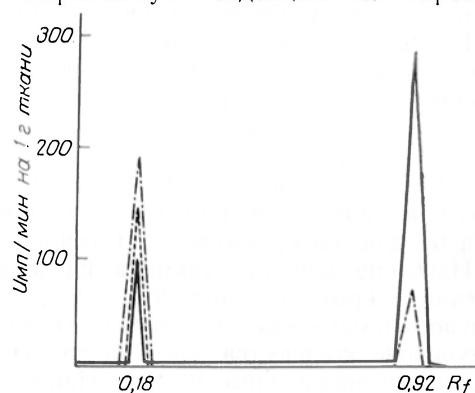


Рис. 5. Хроматографическое разделение ^{14}C -никотиновой кислоты и ее производных из слизистой оболочки изолированного отрезка кишечника крыс при всасывании ^{14}C -никотиновой кислоты.

Концентрация витаминов в люминальном растворе: сплошная линия — $40 \cdot 10^{-6}$ М ^{14}C -никотиновой кислоты; пунктирная — $40 \cdot 10^{-6}$ М ^{14}C -никотиновой кислоты и $3,1 \cdot 10^{-6}$ М тиамина; пунктирная с точкой — $40 \cdot 10^{-6}$ М ^{14}C -никотиновой кислоты и $3,1 \cdot 10^{-3}$ М тиамина. R_f 0,18 — никотиновая кислота; R_f 0,92 — никотинамид.

цией витаминов за АТФ в киназных реакциях [9], которые, как считали, обеспечивали не только образование коферментных форм витаминов, но и процессы трансмембранного переноса [10]. Однако в настоящее время установлено, что мембранный транспорт витаминов B_1 и РР не связан с процессами их фосфорилирования [11, 12].

В экспериментах *in vitro* нами было обнаружено, что большие количества никотиновой кислоты тормозят транспорт тиамин в клетках слизистой оболочки кишечника. В опытах *in situ* большие количества никотиновой кислоты также ингибировали на первых минутах перфузии скорость всасывания тиамин в кишечнике. Причина этого влияния, по-видимому, заключается в нарушении энергообеспечения транспорта тиамин через клеточные мембраны под влиянием никотиновой кислоты.

Как следствие снижения поступления тиамин в клетки под влиянием больших количеств никотиновой кислоты снижается активность кишечной тиаминпирофосфатазы. Как было установлено, поступающий в клетки кишечника свободный тиамин достаточно быстро фосфорилируется [2] и постоянно воспроизводимый фонд тиаминфосфатов уменьшает градиентную концентрацию для входа витаминов из просвета кишечника в клетки слизистой оболочки его [13]. С другой стороны, тиаминфосфаты должны подвергаться процессам дефосфорилирования для обеспечения выхода тиамин в свободном виде в кровь [14]. Последний процесс активируется тиаминпирофосфатазой, поэтому снижение ее активности при всасывании тиамин совместно с большими количествами никотиновой кислоты может быть связано с уменьшением количества субстрата в энтероцитах за счет сниженного поступления тиамин, однако нельзя исключить и другой механизм влияния никотиновой кислоты на активность этого фермента.

Следует обратить внимание еще на один аспект — влияние никотиновой кислоты на кишечный кровоток благодаря ее действию на сосуды [15]. В литературе имеются данные, указывающие на зависимость всасывания веществ в кишечнике (на примере изучения всасывания глюкозы) от скорости кишечного кровотока [16].

Противоположное влияние на всасывание тиамин оказывала никотиновая кислота в физиологической ($40 \cdot 10^{-6}$ М) концентрации.

В опытах *in situ* витамин РР в небольших количествах увеличивал скорость всасывания тиамин в кишечнике, хотя в экспериментах транспорт тиамин в присутствии аналогичного количества никотиновой кислоты изменен не был. Возможно, что действие небольшого количества никотиновой кислоты связано с изменением проницаемости клеточных мембран для тиамин в условиях *in vivo*, что согласуется с мнением некоторых авторов о влиянии никотиновой кислоты на проницаемость плазматических мембран для коферментных витаминов [17].

Изучение влияния тиамин на всасывание никотиновой кислоты в кишечнике крыс показало, что в условиях *in vitro* тиамин не влиял на транспорт никотиновой кислоты в сегменты кишечника крыс. В то же время большие количества тиамин снижали всасывание никотиновой кислоты в кишечнике крыс *in situ*. Наиболее отчетливое влияние на метаболизм никотиновой кислоты в слизистой оболочке кишечника при ее всасывании оказывало различное количество тиамин. При совместном всасывании физиологического количества никотиновой кислоты и тиамин в слизистой оболочке кишечника преимущественно содержалась никотиновая кислота и не было обнаружено ее метаболитов. В отсутствие тиамин или увеличении его в люминальном содержимом до $3,1 \cdot 10^{-6}$ М в слизистой оболочке кишечника было идентифицировано различное количество никотинамида, образующегося при всасывании никотиновой кислоты из поступающего в энтероциты витамин. К сожалению, роль тиамин в метаболизме никотиновой кислоты не установлена, хотя известно, что некоторые звенья метаболизма витаминов В₁ и РР связаны между собой [18].

Учитывая, что процесс всасывания в кишечнике состоит из последовательных стадий транспорта через апикальную мембрану энтероцитов, трансэнтероцитарного транспорта, транспорта через базальную или латеральную плазматические мембраны энтероцитов и далее через систему гистогематического барьера в кровь или лимфу, можно предположить, что взаимодействие между витаминами В₁ и РР осуществляется на различных

уровнях системы всасывания по-разному, причем направленность взаимовлияний витаминов зависит от соотношения количества витаминов в люминальном содержимом.

В связи с этим следует признать, что только правильное сочетание доз витаминов, поступающих в организм пероральным путем, позволит избежать нарушений всасывания витаминов в кишечнике за счет их антагонистических взаимодействий и предотвратить появление эндогенных гиповитаминозов, связанных со снижением усвоения витаминов организмом как за счет количественного снижения всасывания в кишечнике, так и за счет изменения метаболизма витаминов на уровне кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Терруап Т. Взаимодействия витаминов. М., 1969. — 2. Кирилук А. Г. — «Вопр. питания», 1976, № 2, с. 11—15. — 3. Кирилук А. Г. Межвитаминные взаимоотношения. Гродно, 1975, с. 69. — 4. Елисеева Г. Д. — В кн.: Витамины. Ч. 1. Киев, 1953, с. 38—57. — 5. Novikoff A., Goldfisher S. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1961, v. 47, p. 802. — 6. Вовнянко Е. К. — «Укр. биохим. ж.», 1973, № 1, с. 95—100. — 7. Плохинский Н. А. Биометрия. М., 1970. — 8. Rindi G., Ventura U. — «Experientia (Basel)», 1967, v. 23, p. 175—176. — 9. Bisceglie V. — «Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)», 1950, v. 32, p. 162—179. — 10. Machida K. — «Vitamins», 1955, v. 8, p. 224—227. — 11. Rindi G., Ventura U. — «Physiol. Rev.», 1972, v. 52, p. 821—827. — Fox K., Hoghen C. — «Biochim. biophys. Acta», 1974, v. 332, p. 336—340. — 13. Ferrari G., Sciorelli G., Del Poggio P. et al. — «Pflügers Arch. ges. Physiol.», 1975, Bd 356, S. 111—120. — 14. Watanabe J. — «Vitamins», 1962, v. 25, p. 212—217. — 15. Naik S., Rupawala E., Sheth U. — «Bicchem. Pharmacol.», 1970, v. 19, p. 2867. — 16. Lichtenstein B., Winne D. — «Naunyn — Schmiedebergs Arch. Pharmacol.», 1973, Bd 279, s. 153—172. — 17. Тоцкий В. Н., Ольшанецкая В. А. — В кн.: Межвитаминные взаимоотношения. Гродно, 1975, с. 169—171. — 18. Островский Ю. М., Мойсеев А. Г., Мажуль А. Г. и др. Механизмы межвитаминных взаимоотношений. Минск, 1973.

Поступила 30/XI 1976 г.

INTERACTION BETWEEN VITAMINS B₁ AND PP ON ABSORPTION IN RAT INTESTINE

A. G. Kirilyuk, Yu. V. Khmelevsky

Chair of Biochemistry, Medical School, Kiev

Interrelation between vitamins B₁ and PP during absorption in rat intestinum tenue depended on the quantitative ratio of vitamins in luminal contents. Large doses of one of vitamins decreased absorption of physiologic doses of another drug affecting vitamin metabolism in intestinal wall. Excess of nicotinic acid ($40 \cdot 10^{-3}$ M) inhibited thiamine pyrophosphatase activity in intestinal mucosa if thiamine was used at concentration $3 \cdot 1 \cdot 10^{-6}$ M. Use of low amount of ^{14}C -nicotinic acid ($40 \cdot 10^{-6}$ M) caused an occurrence of ^{14}C -nicotinamide in intestinal mucosa; content of nicotinamide was distinctly decreased, when ^{14}C -nicotinic acid was administered simultaneously with $3 \cdot 1 \cdot 10^{-3}$ M thiamine. At the same time, thiamine did not effect on ^{14}C -nicotinic acid accumulation in segments of rat intestinum tenue in vitro.

УДК 616.37-002-092.9-07:616-008.939.15-074

К. Г. Карагезян, Л. М. Овсепян, М. А. Дадаян, К. Г. Адонц

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Институт биохимии Академии наук Армянской ССР, Ереван

Экспериментальный панкреатит характеризуется накоплением перекисей липидов и уменьшением антиокислительной активности липидов в разные сроки после операции. Введение тиосульфата вызывает увеличение антиокислительной активности липидной вытяжки, выделенной из печени панкреатизированного животного, и уменьшение количества перекисей липидов.

Перекисному окислению липидов посвящено большое количество работ. Во многих из них изучается процесс накопления перекисей липидов при лучевой болезни, злокачественных образованиях [1], отравлении

четырёххлористым углеродом [2] и т. д. Согласно современным представлениям, избыточное накопление продуктов окисления перекисей липидов в организме может привести к целому ряду патологических отклонений, в частности к структурной перестройке мембран и изменению метаболических процессов, играющих существенную роль в развитии заболеваний. Субстратами перекисного окисления липидов являются ненасыщенные жирные кислоты с одной, двумя и тремя двойными связями, за счет которых образуются перекиси и гидроперекиси.

Т а б л и ц а 1

Накопление перекисей липидов (МДА) в присутствии НЗП при экспериментальном панкреатите без лечения и при лечении тиосульфатом ($M \pm m$)

День после операции		Контроль (ложная операция)	Панкреатит	
			без лечения	при лечении тиосульфатом
1-й	P	2,95±0,64	3,27±0,17	3,94±0,07
			<0,005	<0,001
3-й	P	2,56±0,15	3,99±0,47	2,78±0,34
			<0,001	<0,005
7-й	P	2,24±0,71	4,94±0,19	2,57±0,08
			<0,001	<0,001
14-й	P	2,45±0,18	4,65±0,18	2,00±0,13
			<0,001	<0,001
30-й	P	2,45±0,18	3,75±0,22	2,20±0,13
			<0,001	<0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2: МДА — малондиальдегид, концентрация его выражена в наномолях на 1 мг белка, в опытах использовано 5 животных.

Согласно современным представлениям [3], существуют две системы перекисного окисления липидов в микросомах. Одна из них характерна только для микросом; донором электронов в ней является НАДФ·Н₂ (НАДФ·Н₂-зависимая система перекисного окисления липидов — НЗП). Вторая функционирует как в микросомах, так и в митохондриях и лизосомах; в качестве источника электронов в ней используются аскорбиновая кислота и ионы железа (аскорбат-зависимая система перекисного окисления липидов — АЗП).

Исходя из изложенного выше, представлялось интересным проследить за динамикой изменения перекисного окисления липидов в НЗП и АЗП, а также за сдвигами в антиокислительной активности липидов в норме и при экспериментальном панкреатите в печени в разные сроки после операции (1, 3, 7, 14 и 30-й дни) до и после лечения тиосульфатом.

М е т о д и к а

Опыты проводили на беспородных белых крысах массой 160—200 г. Острый панкреатит вызывали охлаждением обнаженной поджелудочной железы хлорэтилом. Микросомы печени выделяли в среде сахараза — трис-НСl-буфер [4] и осаждали в центрифуге ВАК-60 при 105 000 g в течение 1 ч. Липидные перекиси микросомальной фракции определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой, интенсивность окраски — спектрофотометрически при 535 нм. Данные рассчитывали на 1 мг белка [5]. Об антиокислительной активности (АОА) судили по степени торможения окисления метилолеата экстрактом, содержащим антиоксиданты. Природные антиоксиданты извлекали из тканей животных в липидной фракции. Липиды растворяли в метилолеате, который затем окисляли продуванием воздуха при 37°C в окислительной ячейке. О степени окисления судили по изменению перекисного числа. За характеристику АОА липидной вытяжки брали величину

$$\frac{\tau - \tau_0}{P},$$

где τ , τ_0 — время образования 0,02 ммоль/г перекисей в метилолеате при окислении последнего с вытяжкой и без вытяжки (в ч); P — концентрация липидов в метилолеате [6].

Результаты и обсуждение

Было установлено, что при экспериментальном панкреатите происходит увеличение количества перекисей как при НЗП, так и при АЗП (табл. 1, 2). Примечательно, что наибольшая концентрация перекисей липидов в микросомальной фракции печени обнаруживается на 7—14-й день после операции.

Стационарная концентрация перекисей определяется, с одной стороны, скоростью процессов, приводящих к их образованию, а с другой — скоростью процессов их разрушения, т. е. присутствием антиоксидантов. Отмеченное нами увеличение количества перекисей на 7—14-й день, очевидно, можно объяснить уменьшением уровня антиоксидантов, наблюдающимся по мере прогрессирования заболевания. Исследования по изучению АОА подтверждают это предположение. Согласно нашим наблюдениям, наибольшее уменьшение АОА липидов приходится также на 7—14-й день развития панкреатита. Так, например, на 7-й день панкреатита АОА составляет 500 ч/мл/г, а на 14-й день — 750 ч/мл/г (табл. 3).

Как известно, перекиси липидов оказывают ингибирующее действие на сульфгидрильные группы белков [7] и в свою очередь сульфгидрильные соединения считаются природными антиоксидантами. Из данных литературы известно [8], что введение тиосульфата в организм при ряде заболеваний вызывает повышение содержания сульфгидрильных групп, что способствует обратному развитию патологического процесса. Исходя из этого, представляло интерес выяснить влияние тиосульфата на концентрацию перекисей при НЗП и АЗП микросомальной фракции печени крыс и на изменение АОА липидных вытяжек.

Как показали наши исследования, введение тиосульфата вызывает увеличение АОА липидной вытяжки. На рисунке даны кинетические кривые накопления перекисей липидов при окислении чистого метилолеата, а также в сочетании его с липидной вытяжкой панкреатизированного цельного животного и леченного тиосульфатом. Как видно из рисунка, при введении тиосульфата наблюдается увеличение периода индукции $\left(\frac{\Delta\tau}{P}\right)$,

накопление 0,02 ммоль перекисей. Увеличение АОА сопровождается сим-батным ему уменьшением количества перекисей в НЗП и АЗП (см. табл. 1, 2).

Тиосульфат, как известно, является ингибитором радикальных процессов. Кроме того, он способствует увеличению фонда эндогенного глю-

Таблица 2

Накопление перекисей липидов (МДА) при АЗП при экспериментальном панкреатите без лечения и при лечении тиосульфатом ($M \pm m$)

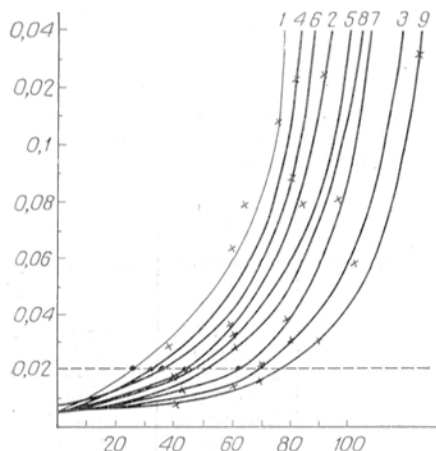
День после операции	Контроль (ложная операция)	Панкреатит	
		без лечения	при лечении тиосульфатом
1-й P	3,98±0,31	5,41±0,73 <0,001	5,03±0,43 <0,001
3-й P	3,78±0,16	4,87±0,18 <0,001	4,27±0,14 <0,001
7-й P	3,25±0,02	5,94±0,44 <0,001	3,08±0,12 <0,001
14-й P	3,20±0,40	5,56±0,27 <0,001	2,99±0,21 <0,001
30-й P	3,70±0,47	4,35±0,59 <0,025	2,47±0,34 <0,001

Таблица 3

Изменение АОА липидов (в ч/мл/г) при панкреатите без лечения и при лечении тиосульфатом

День после операции	Контроль	Панкреатит	
		без лечения	при лечении тиосульфатом
3-й	1500	800	1300
7-й	1500	500	1000
14-й	1500	750	1300
30-й	1500	800	1625

татиона [8]. В свою очередь увеличение содержания глутатиона приводит к ускорению утилизации перекисей липидов с участием глутатионпероксидазной системы. Скорость реакции и сродство к гидроперекисям у глутатионпероксидазы настолько велики, что она может выступать в роли фактора, эффективно конкурирующего за гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, включенные в цепь радикального процесса, ведущего к образованию малондиальдегида.



Влияние липидных вытяжек из печени панкреатизированных крыс на кинетику накопления перекисей при окислении метилоалеата.

По оси ординат — количество перекисей (в ммоль/г); по оси абсцисс — время (в ч). 1 — чистый метилоаллеат; 2—3-й день без лечения (0,025); 3—3-й день лечения (0,03); 4—7-й день без лечения (0,02); 5—7-й день лечения (0,02); 6—14-й день без лечения (0,02); 7—14-й день лечения (0,03); 8—30-й день без лечения (0,03); 9—30-й день лечения (0,04). В скобках приведены концентрации липидных вытяжек в метилоаллеате (в г/мл).

Результаты проведенных исследований со всей очевидностью свидетельствуют об эффективности тиосульфата как ингибитора свободно-радикальных процессов и позволяют рекомендовать его в качестве эффективного лечебного препарата в клинике острых панкреатитов. Полученные результаты намечают реальные пути по дальнейшему изысканию других антиоксидантов, что представляет несомненный научно-практический интерес.

Приносим благодарность заведующему Центральной научно-исследовательской лаборатории Ереванского института усовершенствования врачей Министерства здравоохранения СССР доктору медицинских наук П. С. Симаворяну за оказанную помощь при оперировании экспериментальных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Свободнорадикальные состояния и их роль при лучевом поражении и злокачественном росте (Симпозиум. Тезисы докладов). М., 1971. — 2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972. — 3. Hochstein P., Ernster L. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1963, v. 12, p. 388. — 4. Арчаков А. И., Девиченский В. М. и др. — «Биохимия», 1968, т. 33, с. 479. — 5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. I. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 6. Бурлакова Е. Б., Дзюба Н. М., Пальмина Н. П. и др. — «Докл. АН СССР», 1965, т. 163, № 5, с. 278. — 7. Little S., O'Brien P. — «Biochem. J.», 1967, v. 102, p. 10. — 8. Матинян Г. В. Изменение ферментных систем белкового обмена и функций некоторых органов при хлоропреповом отравлении и противохлоропреповое действие тиосульфата. Автореф. дис. докт. Ереван, 1970.

Поступила 4/XI 1976 г.

PEROXIDATIVE AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES OF LIPIDS IN EXPERIMENTAL PANCREATITIS

K. G. Karagezyan, L. M. Ovsepyan, M. A. Dadayan, K. G. Adontz

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Peroxidation of lipids and alteration in antioxidative activity were studied in normal state and in experimental pancreatitis within 1, 3, 7, 14 and 30 days after the operation. Experimental pancreatitis was accompanied by increase in content of lipid peroxides and by decrease in antioxidative activity of lipids extracted from liver tissue. Administration of thiosulfate decreased slightly the lipid peroxides content and increased the level of antioxidants in pancreatitis. The data obtained suggest that thiosulfate is effective inhibitor of free radical oxidation; it may be used as therapeutic drug in acute pancreatitis.

В. В. Федуров

АКТИВАЦИЯ ВКЛЮЧЕНИЯ МЕЧЕНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В УБИХИНОН В СРЕЗАХ ГИПЕРТРОФИРОВАННОЙ ПОЧКИ КРЫСЫ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Киевского медицинского института

Исследовали влияние введения крысам циклогексимида (ЦГ), бромистого этидия (БЭ) и окситетрациклина (ОТЦ) на включение метки из $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон и холестерин и из равномерно меченого ^{14}C -тирозина в убихинон в срезах гипертрофированной почки в первые 2 дня после односторонней нефрэктомии. Включение обоих предшественников в убихинон и $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в холестерин значительно увеличивается срезами гипертрофированной почки. Инъекция ЦГ сразу после операции и повторно через 24 ч подавляет гипертрофию почки, полностью ингибирует включение метки в холестерин и частично в убихинон. На этом основании сделан вывод об усилении в гипертрофированной почке скорости новообразования ферментов, ответственных за синтез этих соединений. Инъекции БЭ сразу после операции достоверно ингибируют включение метки в убихинон и не влияют на включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в холестерин. Инъекции ОТЦ не оказали влияния на включение метки в оба соединения. Высказано предположение об участии митохондриальных ДНК в кодировании некоторых функционально активных белков, участвующих в биосинтезе убихинона.

Включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон и холестерин срезами гипертрофированной почки крысы увеличивается в первые дни после односторонней нефрэктомии [1], что может быть обусловлено усилением новообразования в растворимой части клеток ферментов, осуществляющих синтез общих предшественников — мевалоната и изопентилпирофосфата [2, 3]. В эти же сроки в почке обнаружено более интенсивное новообразование митохондрий [1]. Во внутренней мембране этих органелл сосредоточена основная часть внутриклеточного фонда убихинона [4], здесь же локализованы ферменты, синтезирующие его из тирозина и изопентилпирофосфата [2]. Возможно, стимуляция включения метки в убихинон при компенсаторной гипертрофии почки частично связана и с активацией скорости образования этих ферментов. Митохондрии обладают собственным белоксинтезирующим аппаратом [5], однако генетическое происхождение ферментов, ответственных за образование в них убихинона, неизвестно. Принимая во внимание, что ингибиторный анализ широко применяется для выяснения роли белоксинтезирующих аппаратов клетки в регуляции метаболизма, в данной работе изучено влияние введений крысам с односторонней нефрэктомией циклогексимида (ЦГ) — ингибитора цитоплазматического белкового синтеза [6], бромистого этидия (БЭ) и окситетрациклина (ОТЦ) — ингибиторов митохондриального синтеза белков [7] на включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата и равномерно меченого ^{14}C -тирозина в убихинон и холестерин срезами гипертрофированной почки крыс.

Методика

Опыты поставлены на белых беспородных крысах-самцах массой 130—180 г. Удаляли правых почек, получение 2 г срезов для одного опыта из почек 3—4 животных, их инкубацию с мечеными соединениями и выделение из срезов неомыляемых липидов производили ранее описанными способами [1]. В качестве метки использовали $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат Всесоюзного объединения «Изотоп» (удельная радиоактивность 9,8 мКи/ммоль) и равномерно меченный ^{14}C -тирозин фирмы UUVVR (ЧССР) (удельная радиоактивность 315 мКи/ммоль), которые добавляли в среду инкубации в количестве 5 и 2 мКи соответственно. Все растворители были отечественного производства, перед употреблением их освобождали от перекисей общепринятыми способами. Из неомыляемых липидов убихинон-9 выделяли и очищали до постоянной удельной активности (в импульсах в минуту на 1 мг) хроматографированием на тонких слоях силикагеля LSL₂₅₄ (первые два этапа) и пленках «силуфол» UV₂₅₄ (ЧССР) в следующей системе растворителей: бензол; 15% ацетон в петролейном эфире; 95% водный ацетон (пленки пропитывали 3% раствором вазелинового масла в петролейном эфире); н-гексан; бензол. Холестерин выделяли с хроматограмм после первого этапа хроматографирования и очищали до постоянной удельной активности [1]. Радиоактивность убихинона-9 и холестерина определяли в газопотоочном счетчике, количество убихинона на мишенях — при помощи спектрофотометрии, хо-

лестерина — на ФЭК-М [1]. Исследовали несколько групп животных с удаленными правыми почками. ЦГ («Koch-Light Laboratories», Англия) в количестве 0,125 мг на 100 г массы тела и 1,0 мг на 100 г массы тела БЭ («Calbiochem», США) вводили внутривентриально сразу после нефрэктомии в виде водного раствора, ОЦ («Geotusipum, Pliva», Югославия) в суточной дозе 20 мг/100 г массы тела вводили внутримышечно 2 раза в день [7]. Статистическую обработку результатов проводили по [8].

Результаты и обсуждение

После правосторонней нефрэктомии вес левой почки за 2 сут увеличивался почти на 13% (см. таблицу). Включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон и холестерин и ^{14}C -тирозина в убихинон срезами гипертрофированных почек было выше по сравнению с включением в срезы удаленных почек, которые служили контролем. Отметим, что наиболее высокая скорость включения обоих предшественников в убихинон наблюдалась на 2-е сутки после нефрэктомии.

Влияние введений крысам ЦГ, БЭ и ОЦ на включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата и ^{14}C -тирозина в убихинон и холестерин тонкими срезами гипертрофированных почек ($M \pm m$)

Время после нефрэктомии, ч	Суточная доза ингибитора, мг/100 г	Коэффициент: вес правой почки / вес левой почки	Включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата имп/мин/мг		Включение ^{14}C -тирозина в убихинон, имп/мин/мг
			убихинон	холестерин	
0 (правая почка)	—	—	934 \pm 82 (35)	223 \pm 39 (35)	1025 \pm 141 (25)
24	—	1,067 \pm 0,019 (26)	2353 \pm 506* (4)	640 \pm 104* (4)	1711 \pm 702 (5)
	ЦГ 0,125	1,035 \pm 0,014 (34)	1483 \pm 178 (4)	150 \pm 51** (4)	1033 \pm 371 (5)
48	—	1,129 \pm 0,017 (37)	3906 \pm 382* (6)	779 \pm 117* (6)	1759 \pm 172* (4)
	ЦГ 0,125	1,077 \pm 0,026 (13)	2398 \pm 394** (2)	273 \pm 28** (2)	1231 \pm 870 (2)
	БЭ 1	1,073 \pm 0,019 (30)	1676 \pm 275** (4)	667 \pm 162 (4)	994 \pm 229** (4)
	ОЦ 20	1,163 \pm 0,017 (32)	2816 \pm 361 (4)	722 \pm 149 (4)	2401 \pm 367 (4)

Примечание. В скобках дано число определений. Одна звездочка — $P < 0,05$ по сравнению со срезами удаленных почек; две звездочки — $P < 0,05$ по сравнению со срезами гипертрофированных интактных почек.

Инъекции ЦГ несколько подавляли гипертрофию почек, полностью снимали активацию включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в холестерин и частично в убихинон. Этот эффект инъекций ЦГ на включение радиоактивных соединений в убихинон и холестерин является убедительным свидетельством того, что в компенсаторно гипертрофированной почке наблюдается усиление новообразования в цитоплазме ферментов, осуществляющих синтез их общих предшественников. Учитывая регуляторную роль фонда мевалоната в синтезе стероидов у крыс [3], можно полагать, что в оставшейся после мононефрэктомии почке происходит значительное увеличение образования ключевого фермента его синтеза мевалонат : НАДФ-оксидоредуктазы. Значительная активация этого фермента в органах животных наблюдается при ряде экстремальных состояний [9]. Так как ингибирование ЦГ включения меток в убихинон было менее выраженным, особенно через 48 ч после нефрэктомии, то, возможно, в оставшейся почке также увеличивается новообразование в митохондриях ферментов, осуществляющих конечные стадии построения молекул этого соединения. Следует отметить, что повторная инъекция ЦГ вызывала гибель примерно 50% крыс. Однако, как было установлено в предварительных экспериментах, меньшие дозы ЦГ вызывали менее выраженный ингибирующий эффект.

Включение метки в убихинон из обоих предшественников срезами 2-дневных гипертрофированных почек крыс, которым вводили БЭ, было достоверно ниже по сравнению со срезами гипертрофированных почек контрольных крыс, однако синтез холестерина был одинаковым у животных обеих групп. Известно, что БЭ блокирует синтез белка внутри митохондрий на уровне транскрипции [7]. Угнетение включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата и ^{14}C -тирозина в убихинон в срезах гипертрофированных почек крыс, получавших БЭ, может свидетельствовать о том, что новообразование каких-то митохондриальных ферментов, принимающих участие в биосинтезе убихинона, нарушается и их кодирование осуществляется митохондриальной ДНК.

Предобработка нефрэктомизированных животных ОТЦ не оказывала достоверного влияния на включение метки в убихинон из обоих предшественников. Так как ОТЦ — ингибитор митохондриальной трансляции [7], то эти данные в какой-то мере противоречат предыдущему выводу. Однако следует иметь в виду, что для проявления ингибирующего действия ОТЦ на митохондриальную белоксинтезирующую систему, например, в регенерирующей печени крыс необходимо, чтобы концентрация этого антибиотика была не ниже 6—7 мкг/мл крови животных [7]. Возможно, нам не удалось достигнуть необходимой для проявления действия ОТЦ его концентрации в почках крыс с односторонней нефрэктомией, хотя его вводили в рекомендуемых с этой целью дозах [7]. С другой стороны, этот факт может быть расценен как доказательство того, что синтез белков в митохондриях почек имеет ряд своих, невыясненных полностью особенностей [10]. Вместе с тем очевидно, что предположение о кодировании митохондриальной ДНК каких-то функциональных белков митохондрий, принимающих участие в биосинтезе убихинона, нуждается в дополнительной проверке.

Таким образом, активация включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон и холестерина и ^{14}C -тирозина в убихинон в значительной степени связана с усилением новообразования ферментов, осуществляющих синтез их общих предшественников. Кроме того, новообразование ферментов биосинтеза убихинона внутри митохондрий, по-видимому, также увеличивается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федуров В. В. — «Вопр. мед. химии», 1976, № 4, с. 472. — 2. Trum-power B. L., Houser R. M., Olson R. E. — «J. biol. Chem.», 1974, v. 249, p. 3041. — 3. Aiyar A. S., Olson R. E. — «Europ. J. Biochem.», 1972, v. 27, p. 60. — 4. Федуров В. В. — «Успехи совр. биол.», 1976, т. 82, с. 3. — 5. Vettie D. S. — «Sub.-Cell. Biochem.», 1971, v. 1, p. 1. — 6. Галкин А. П. — В кн.: Молекулярная биология. Вып. 12. Киев, 1975, с. 44. — 7. Kroon A. M., DeVries H. — In: Boardman N. K. et al. (Eds) *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*. Amsterdam, 1971, p. 318. — 8. Монцевичуте-Эрингел Е. В. — «Пат. физиол.», 1964, № 7, с. 71. — 9. Aiyar A. S., Gopalaswamy U. V. — «Greenivasan A. — «Environ. Physiol. Biochem.», 1972, v. 2, p. 86. — 10. Devlin Th. M., Chih J. J. — «Arch. Biochem.», 1972, v. 152, p. 521.

Поступила 22/XI 1976 г.

ACTIVATION OF LABELLED PRECURSORS INCORPORATION INTO UBIQUINONE IN SLICES OF RAT HYPERTROPHIC KIDNEY

V. V. Fedurov

Central Research Laboratory, Medical School, Kiev

Effect of cycloheximide, ethidium bromide and hydroxytetracycline on incorporation of label from $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate into ubiquinone and cholesterol as well as from diffusively labelled ^{14}C -tyrosine into ubiquinone was studied in slices of rat hypertrophic kidney within 2 days after unilateral nephrectomy. Incorporation of these labels into ubiquinone and of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate into cholesterol was distinctly increased using slices of hypertrophic kidney. Repeated administration of cycloheximide just after the operation and within 24 hrs after it depressed the kidney hypertrophy, inhibited completely the label incorporation into cholesterol and partially — into ubiquinone. This suggests that the rate of enzymes production, responsible for synthesis of these substances, is increased in hypertrophic kidney. Injection of ethidium bro-

mide after the operation inhibited distinctly the label incorporation into ubiquinone and did not effect on incorporation of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate into cholesterol. Hydroxytetracycline proved to be ineffective in these labels incorporation. Mitochondrial DNA appears to participate in coding of some functionally active proteins responsible for ubiquinone biosynthesis.

УДК 612.111.015.348-06:612.015.615

Л. М. Бронштейн, А. А. Анисимов, Г. В. Облизина,
С. С. Дубовская, И. Ш. Рабинович

ВЛИЯНИЕ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА ВИТАМИНОМ К НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ БЕЛКОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН

При разделении белков мембран эритроцитов крыс методом электрофореза в геле акриламида удается получить до 11 фракций. Первичная и вторичная недостаточность витамина К приводит к изменению количества пиков, их площади и процентного соотношения.

Многие вопросы механизма действия жирорастворимых витаминов до настоящего времени остаются невыясненными. В последние годы появились данные, позволяющие считать, что с жирорастворимыми витаминами связаны стабильность, структура и функции биомембран. Сведения, указывающие на значение витамина К для функционального состояния биомембран, носят пока в основном косвенный характер. Lev [1] опубликовал результаты опытов с микроорганизмом *Fusiformis nigrescens*, у которого при дефиците витамина К обнаружено изменение оболочки при повышенном содержании в клетках РНК. Regumal и соавт. [2] установил, что повреждение лизосом слизистой оболочки толстой кишки крыс с А-гипервитаминозом можно устранять с помощью витамина $K_{1(20)}$. Как при введении витамина животным с гипервитаминозом, так и при его добавлении к инкубационной среде предотвращалось повышение активности лизосомальных ферментов: β -глюкуронидазы, кислой фосфатазы и этилсульфатазы; L-токоферол такого действия не оказывал. Обнаруженные факты авторы расценивали как свидетельство влияния витаминов А и К на лизосомальные мембраны.

Tetsuga и Shigeo [3], изучая распределение меченных ^{14}C по метильной группе витаминов K_1 , $K_{2(20)}$ и K_3 в субклеточных фракциях печени крыс, установили, что витамин $K_{2(20)}$ имеет большое сродство к внутренней мембране митохондрий.

Masazumi и соавт. [4] показали, что различные производные филлохинона, убикинона и L-токоферола, являющиеся продуктами обмена биохинонов, тормозят освобождение кислой фосфатазы и β -глюкуронидазы из изолированных лизосом печени крыс, инкубируемых в гипотоническом буфере. Особенно существенным для стабилизации лизосомальных мембран было наличие в испытанных соединениях 3'-гидроксильной группы и углеродных атомов в боковой цепи независимо от наличия двойных связей. О значении боковой цепи для связывания биохинонов клеточными органолами свидетельствуют опыты [3], в которых было обнаружено, что имеющие длинные изопреноидные боковые цепи витамины K_1 и $K_{2(20)}$ после их введения крысам проявляют значительное сродство к митохондриальной фракции гепатоцитов тогда как лишенный боковой цепи и наименее липофильный витамин K_3 распределяется по всем клеточным фракциям. Эти данные интересно сопоставить с сообщением Bagaud и соавт. [5] о том, что у цыплят, находящихся на Е-авитаминозной диете, удается предотвратить развитие мышечной дистрофии и усиленный гемолиз эритроцитов при скапливании им фитола вместо витамина Е.

Bancher и Washittl [6] объясняют чрезвычайно высокую устойчивость к γ -облучению витаминов К, Е, убикинона и пластохинона зеленых растений наличием адсорбционных связей этих соединений с неполярными группами биомембран хлоропластов и митохондрий.

Непосредственной предпосылкой к настоящему исследованию послужили результаты опытов И. И. Матусиса и соавт. [7], согласно которым при К-витаминной недостаточности изменяется проницаемость мембран эритроцитов. Авторы приходят к такому заключению на основании того, что в плазме животных с авитаминозом К появляется гексокиназная активность, которая в норме обнаруживается в крови только в эритроцитах.

Целью настоящей работы являлось изучение белкового спектра мембран эритроцитов методом электрофореза в полиакриламидном геле при различных видах авитаминоза К, сопоставление результатов с аналогичными показателями у животных, находящихся на рационе вивария, сопоставление результатов с таковыми у животных, находящихся под воздействием алиментарного фактора или соответствующего хирургического вмешательства и получающих викасол.

Методика

Опыты были проведены на взрослых беспородных белых крысах массой 200—250 г. К-витаминную недостаточность вызывали двумя методами: содержанием животных на К-авитаминозной диете (алиментарный, первичный авитаминоз) по Mameesh и Johnson [8]; перевязкой желчного протока с последующим его рассечением по методу Б. А. Кудряшова и соавт. (вторичный авитаминоз) [9]. О развитии К-витаминной недостаточности судили по удлинению протромбинового времени, определяемого микрометодом В. П. Балуды и соавт. [10], а также на основании общего состояния животных. Контролем служили животные, получавшие обычный пищевой рацион вивария, а для животных с первичной К-витаминной недостаточностью — крысы, находившиеся на К-авитаминозной диете и ежедневно получавшие подкожно по 1 мг водорастворимого аналога витамина К викасола. Для животных со вторичной К-витаминной недостаточностью контролем служили крысы, подвергшиеся операции перевязки и рассечения желчного протока и получавшие подкожно по 1 мг викасола ежедневно.

Эритроцитарные мембраны выделяли по методу Керпер и Масеу [11]. Суспензию мембран растворяли в смеси фенол — мочевины — уксусная кислота. Согласно данным Bagdasarian и соавт. [12], эта смесь является хорошим растворителем для белков эритроцитарных мембран и обладает небольшой гидролитической активностью. Белок определяли методом Лоури и соавт. [13]. Белки эритроцитарных мембран разделяли в полиакриламидном геле 6,6% концентрации согласно методике, предложенной Лимбером и соавт. [14]. Гели денситометрировали в денситометре ЭРИ-65 м, определяли абсолютную площадь каждого пика и вычисляли процентное соотношение пиков. В связи с тем что количество фракций у подопытных животных варьировало, мы разделили фореграммы на условные зоны. Каждую из зон описывали по площади, процентному соотношению ее с другими зонами и количеству фракций в ней. Нумерацию зон ввели от линии старта (рис. 1). Полученные результаты статистически обработаны по методу Е. В. Монцевичюте-Эрингене [15].

Результаты и обсуждение

Сопоставление качественной и количественной характеристик условных зон протеинограмм у животных опытных и контрольных групп показало, что первая зона была наиболее стабильной по количеству пиков, у всех исследуемых животных она содержала один пик. Существенный интерес представляет то обстоятельство, что во второй зоне количество пиков при первичном авитаминозе больше, чем у здоровых животных (при авитаминозе в основном 4, у здоровых 0—5). У крыс, содержащихся на К-авитаминозной диете, получавших викасол, число пиков меньше, чем у здоровых (0—2). При вторичном авитаминозе К во второй зоне, как правило, встре-

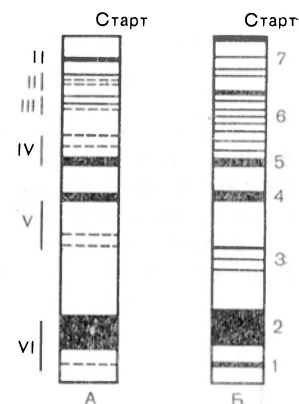


Рис. 1. Схема электрофоретической разделения белков эритроцитарной мембраны (А) и сыворотки крови (Б) в геле акриламида.

Римские цифры — нумерация зон. Сплошная линия — фракция, постоянно присутствующая во всех группах животных; пунктирная — фракция, встречающаяся в определенных группах животных. 1 — преальбумин; 2 — альбумин; 3 — L₁; 4 — церулоплазмин 2-β; 5 — трансферрин 1-β; 6 — L₂; 7 — γ₁.

чается только один пик, и, что особенно важно, при введении оперирован- ным животным викасола число пиков в этой зоне не меняется. Вероятно, это связано с тем, что отсутствие разделения в этой зоне не вызвано недо- статком витамина К, а связано со сложной картиной обтурационной желту- хи, которая сопровождает вторичную К-витаминную недостаточность, об- условленную перевязкой и рассечением желчного протока.

Т а б л и ц а 1

Сопоставление площадей второй зоны электрофореграмм белков у животных опытных и контрольных групп

Группа животных	Площадь
Рацион вивария	32,80±7,07
Первичный авитаминоз	63,10±11,98
Первичный авитаминоз + - викасол	17,65±3,53
Вторичный авитаминоз	70,60±9,55
Вторичный авитаминоз + - викасол	18,20±9,10

Т а б л и ц а 2

Сопоставление отношений площадей второй зоны электрофореграмм (в %) у животных опытных и контрольных групп

Группа животных	Отношение пло- щадей
Рацион вивария	7,29±1,58
Первичный авитаминоз	21,40±7,04
Первичный авитаминоз + - викасол	5,54±1,08
Вторичный авитаминоз	19,70±4,70
Вторичный авитаминоз + - викасол	4,33±2,17

В третьей зоне в основном встречается 3 полосы. Наиболее стабильными из них являются две, наличие третьей более характерно для первичного авитаминоза К, однако закономерно, так как и в контрольных группах у ряда животных в этой зоне 3 полосы.

В четвертой зоне у здоровых животных определяется от 3 до 1 полосы. При первичном авитаминозе К мы не отметили ни одного случая с 3 полоса-

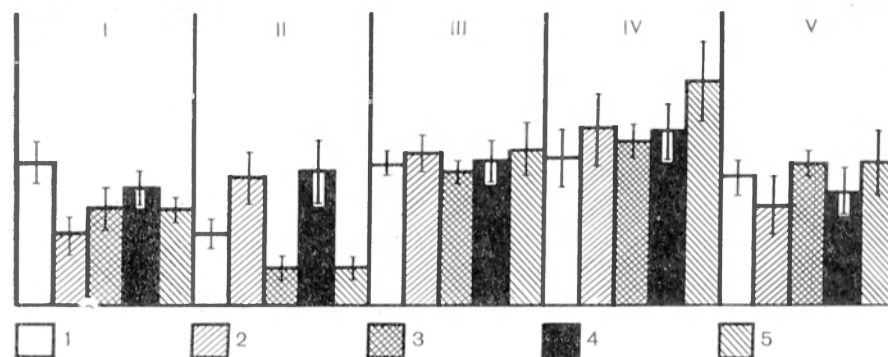


Рис. 2. Сопоставление площадей зон электрофореграмм белков у животных раз-
личных групп.

Римские цифры — нумерация зон. 1 — животные, находящиеся на рационе вивария; 2 — на К-авитаминозной диете; 3 — на К-авитаминозной диете + викасол; 4 — животные с пере-
вязанным и рассеченным желчным протоком; 5 — животные с перевязанным и рассече-
нным желчным протоком, получающие викасол.

ми, по 1 и 2 полосы примерно равное число повторностей. При вторичном авитаминозе К число полос возрастает до 4,5. Увеличено количество полос в этой зоне по сравнению с таковым у животных, находящихся на рационе вивария, и у оперированных крыс, получавших викасол. Это также, видимо, указывает на неспецифический характер изменений числа полос в четвертой зоне для К-витаминной недостаточности.

Пятая зона включает одну стабильную фракцию во всех группах жи-
вотных, лишь при первичном авитаминозе К встречаются по 2 и 3 полосы в
пределах этой зоны.

Шестая зона представлена 1 либо 2 полосами наиболее подвижных белков. Характеристика фракций этой зоны для нас затруднительна, так как при удобных для наших целей условиях фореа эти фракции часто оказывались за пределами геля.

Помимо вышеописанных качественных отличий, в протеинограммах, которые нам удалось наблюдать на животных опытных и контрольных групп, выявлены различия в количественной характеристике отдельных пиков и зон. Четкие, статистически достоверные различия получены во второй зоне, площадь которой при первичном и вторичном авитаминозе выше, чем у животных контрольных групп. При определении процентного соотношения между отдельными зонами оказалось, что удельный вес второй зоны среди других зон при обоих видах авитаминоза выше, чем в обеих контрольных группах (табл. 1, 2). При первичном авитаминозе достоверно уменьшена площадь первой зоны ($33,45 \pm 9,08$) по сравнению с электрофореграммами белков мембран эритроцитов животных, находящихся на рационе вивария ($68,96 \pm 11,85$); в третьей и четвертой зонах достоверных количественных различий у контрольных и подопытных животных не обнаружено (рис. 2, 3).

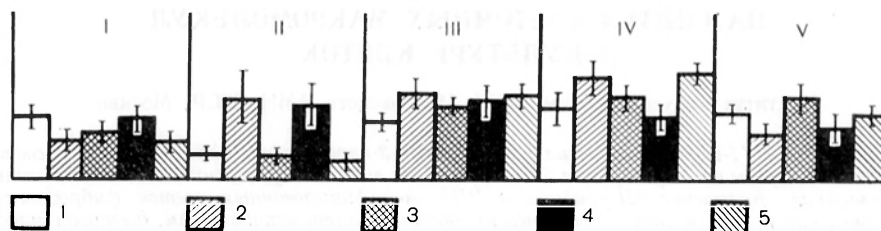


Рис. 3. Сопоставление процентных соотношений зон электрофореграмм у животных различных групп. Обозначения те же, что на рис. 2.

В пятой зоне имеется явная тенденция к снижению площади по сравнению с контрольными группами, однако эти различия статистически недостоверны.

Таким образом, анализ приведенного материала свидетельствует о справедливости предположения относительно значения витамина К для состояния эритроцитарных мембран. Однако механизм влияния обеспеченности организма витамином К на состояние эритроцитарных мембран пока неясен. Можно лишь отметить, что хорошо известные факты снижения интенсивности синтеза протромбина и ряда других белков системы свертывания крови при авитаминозе К свидетельствуют о принципиальной возможности участия этого витамина в регуляции биосинтеза белков, в том числе, вероятно, и белков эритроцитарных мембран [16, 17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Lev M. — «J. Bact.», 1968, v. 95, p. 2317.
2. Perumal A. S., Rakshman M. R., Sama H. R. — «Biochim. biophys. Acta», 1968, v. 176, p. 399.
3. Konishi Tetsuga, Baba Shigeo — «Chem. pharm. Bull.», 1973, v. 21, p. 1906.
4. Watanabe Masazumi, Negishi Ryokichi, Imada Isuke et al. — Ibid., 1974, v. 22, p. 183.
5. Baraud J., Courbin P., Maurice A. — «C. R. Acad. Sci. (Paris)», 1969, v. 268 D, p. 1339.
6. Bancher E., Washitt J. et al. — «Wien. Tierärztl. Mschr.», 1973, Bd 60, S. 107.
7. Матусис И. И., Бронштейн Л. М., Дергунова Н. Д. и др. — В кн.: Материалы 3-го Всесоюзного биохимического съезда. Т. 2. Рига, 1974, с. 194.
8. Mameesh M. S., Johnson B. C. — «J. Nutr.», 1958, с. 65, p. 161.
9. Кудряшов Б. А., Улитина П. Д., Пугачева А. Н. — «Бюлл. exper. биол.», 1941, № 2, с. 99.
10. Балуда В. П., Маляровский В. Н., Ойвин И. А. — В кн.: Лабораторные методы исследования свертывающей системы крови. М., 1962, с. 83.
11. Kerper R., Masey M. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1966, v. 23, p. 202.
12. Bagdasarian M., Matheson N. A., Singer R. J. M. — «Biochem. J.», 1964, v. 91, p. 91.
13. Lowry O. H. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265.
14. Limber J. K., Davis R. F., Bakerman S. — «Blood», 1970, v. 37, p. 111.
15. Монценчуте

Эрингене Е. В. — «Пат. физиол.», 1964, № 4, с. 71. — 16. Богданов Н. Г., Лидер В. А. — «Бюлл. exper. биол.», 1968, № 3, с. 60. — 17. Матусис И. И. — В кн.: Витамины J. Эволюционная, сравнительная и возрастная витаминология. Киев, 1970, с. 154.

Поступила 30/XI 1976 г.

EFFECT OF VITAMIN K ON THE ELECTROPHORETIC MOBILITY OF PROTEINS FROM ERYTHROCYTE MEMBRANES

L. M. Bronstein, A. A. Anisimov, G. V. Oblizina, S. S. Dubovskaya, I. Sh. Rabinovich

Proteins from rat erythrocyte membranes were separated by polyacrylamide gel disc electrophoresis. Up to 11 fractions were obtained. Number of these fractions, their content and ratios were altered in rats with primary or secondary vitamin K deficiency.

УДК 576.35.042.2.085.23

Н. Л. Пушкарская, В. В. Дикий, Г. А. Галегов

ВЛИЯНИЕ 1-D-РИБОФУРАНОЗИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-КАРБОКСАМИДА НА СИНТЕЗ КЛЕТОЧНЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, Москва

Рибовирин (1-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) при введении в состав питательной среды в концентрации 25 и 100 мкг/мл вызывает угнетение синтеза клеточных макромолекул. Включение ^3H -уридина в РНК неинфицированных клеток фибробластов эмбрионов кур ингибируется к 3-му часу инкубации с антиметаболитом, достигая максимума к 6-му часу (ингибирование 80%). Полученные результаты, а также данные литературы указывают на выраженную способность рибовирина подавлять синтез РНК как собственно клеточных, так и вирусспецифических.

В 1972 г. Витковский и соавт. синтезировали нуклеозид 1-D-рибофуранозил-1, 2, 4-триазол-3-карбоксамид, получивший название рибовирин. Рибовирин представляет собой аналог 5-амино-4-имидазол-карбоксамидрибозид [1]. Интерес к нему вызван тем, что препарат обладает способностью подавлять репродукцию многих видов РНК- и ДНК-содержащих вирусов [2—4]. Показано, что рибовирин в форме 5'-монофосфата ингибирует активность инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы, вследствие чего подавляется синтез ксантозиловой и гуаниловой кислот. В связи с вышеизложенным остается неясным вопрос об избирательности противовирусного действия препарата, так как теоретически он способен повреждать синтез как вирусных, так и собственно клеточных РНК.

Целью настоящего исследования было изучение влияния рибовирина на синтез макромолекул в культуре неинфицированных клеток эмбрионов кур.

Методика

Рибовирин был получен из Отдела Ледерле Америкэн Цианамид Компани, США. Синтез макромолекул изучали в первично-трипсинизированной культуре клеток фибробластов эмбрионов кур через 24 ч инкубирования в среде 199, содержащей 10% бычьей сыворотки. Через 24 ч среду инкубирования замещали средой поддержки (среда 199 без бычьей сыворотки). В состав среды поддержки вводили рибовирин в концентрации 25 и 100 мкг/мл.

В качестве предшественников синтеза клеточных РНК, ДНК и белков использовали соответственно ^3H -уридин (удельная активность 23,5 мкКи/ммоль), ^{14}C -тимидин (удельная активность 48,4 мкКи/ммоль) и ^{14}C -гидролизат аминокислот (удельная активность 1 мкКи/мл). Меченые предшественники вносили в состав среды поддержки в конечной концентрации 5 мкКи/мл за 60 мин до фиксации проб. О синтезе тотальных клеточных РНК, ДНК и белков судили по включению в кислотонерастворимую фракцию меченых изотопов через 3, 6, 9 и 12 ч после внесения препарата в состав среды поддержки. Кислотонерастворимую фракцию выделяли по методу Лоури [5]. После трехкратного отмывания охлажденным до 3°C физиологическим раствором, 5% холодной ТХУ и эфирспиртовой смесью к пробам добавляли 0,5 М раствор NaOH и помещали при

37°C на 12—14 ч. Аликвоты по 0,1 мл гидролизата наносили на хроматографическую бумагу (ватман № 3). Радиоактивность подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Паккард» и выражали в импульсах в 1 мин на 0,1 мл гидролизата.

Для проведения седиментационного анализа РНК монослой подвергали лизису буферным раствором STE pH 8,5, содержащим 1% додецилсульфата натрия, и проводили экстракцию РНК фенольно-детергентным методом на холоду. Седиментационный анализ выполняли в линейном градиенте концентраций (15—35%) сахарозы (ротатор 3×25, центрифуга «Superspeed»-65 при 20 000 об/мин 17 ч) с последующим фракционированием и определением радиоактивности по фракциям. Синтез всех групп макромолекул изучали параллельно на одной и той же партии клеточных культур, выращенных во флаконах № 76. В графиках суммированы результаты трех экспериментов.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена динамика подавления синтеза РНК под влиянием рибовирина в концентрации 25 и 100 мкг/мл. Подавление включения ^3H -уридина начинается с 3 ч после внесения препарата и достигает максимального уровня (80—85%) к 6 ч инкубирования монослоя клеток с препаратом. Синтез ДНК при добавлении препарата в среду поддержки ингибируется не более чем на 30—40% (рис. 2). Подавление включения ^3H -тимидин наблюдается на всех сроках инкубации. Синтез клеточных ДНК в контрольных культурах уменьшается по мере «старения» культуры (кривая 1). На фоне естественного убывания включения изотопа в конт-

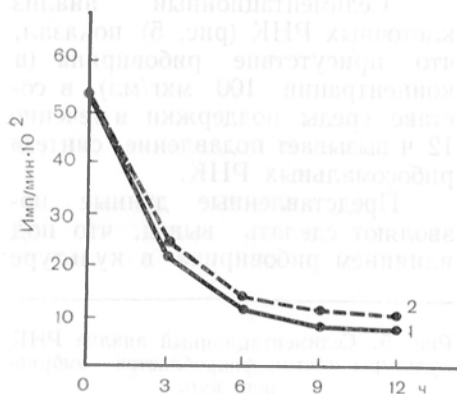


Рис. 1. Влияние рибовирина в различных концентрациях на включение ^3H -уридина в РНК клеток фибробластов эмбрионов кур.

1 — 100 мкг/мл; 2 — 25 мкг/мл.

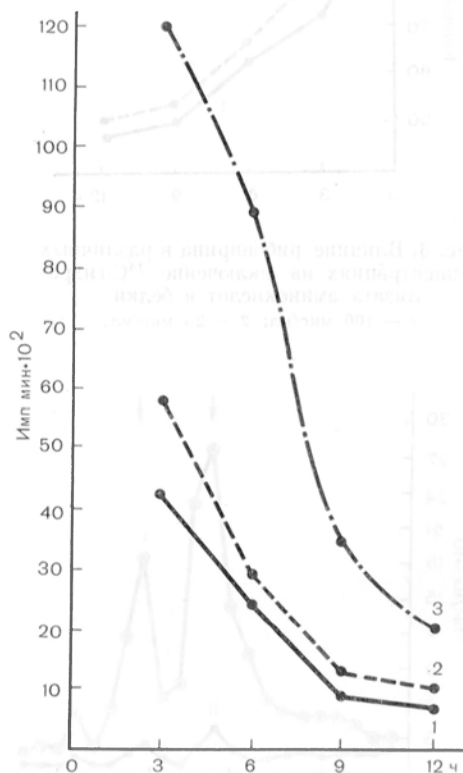


Рис. 2. Влияние рибовирина в различных концентрациях на включение ^{14}C -тимидина в ДНК клеток фибробластов эмбрионов кур.

1 — 100 мкг/мл; 2 — 25 мкг/мл; 3 — контроль.

рольные культуры наблюдается ингибирование клеточного синтеза ДНК под действием рибовирина в концентрации как 25 мкг/мл, так и 100 мкг/мл.

Ингибирование включения ^{14}C -гидролизата аминокислот достигает 30% к 9 ч инкубирования клеток с препаратом (рис. 3). Синтез белка в культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов в наименьшей степени повреждается под действием рибовирина, что выявляется лишь спустя 9 ч после внесения препарата в среду поддержки.

Как видно из рис. 4, через 12 ч инкубирования клеток в присутствии различных концентраций рибовирина включение ^3H -уридина в клеточные

РНК ингибируется на 50%, начиная с концентрации препарата 25 мкг/мл, и достигает максимального значения (80%) при концентрации 100 мкг/мл и более. Полного подавления синтеза РНК в культуре клеток фибробластов эмбрионов кур при дальнейшем увеличении концентрации препарата до 800 мкг/мл не обнаружено.

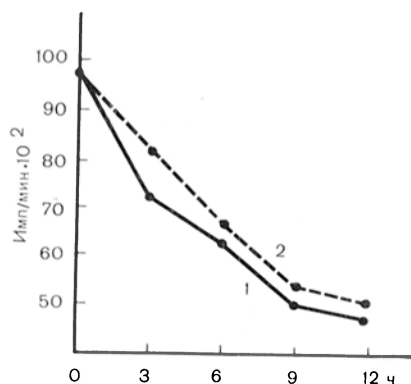


Рис. 3. Влияние рибовирина в различных концентрациях на включение ^{14}C -гидролизата аминокислот в белки.
1 — 100 мкг/мл; 2 — 25 мкг/мл.

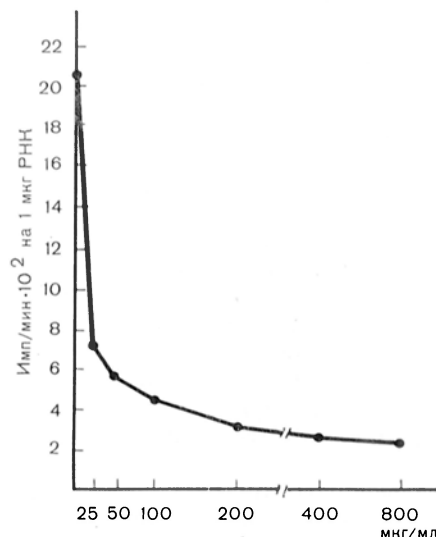
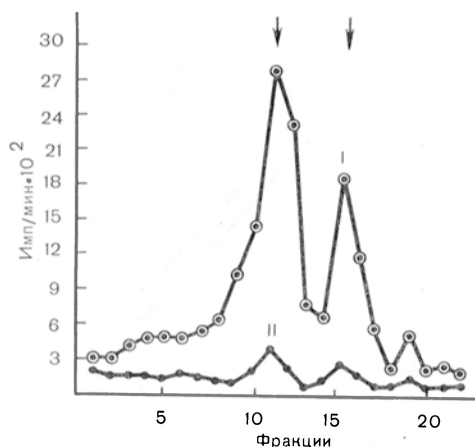


Рис. 4. Влияние рибовирина в различных концентрациях на включение ^3H -уридина в РНК клеток фибробластов эмбрионов кур через 12 ч инкубации.



Седиментационный анализ клеточных РНК (рис. 5) показал, что присутствие рибовирина (в концентрации 100 мкг/мл) в составе среды поддержки в течение 12 ч вызывает подавление синтеза рибосомальных РНК.

Представленные данные позволяют сделать вывод, что под влиянием рибовирина в культуре

Рис. 5. Седиментационный анализ РНК культуры клеток фибробластов эмбрионов кур.

1 — контроль, 2 — рибовирин в концентрации 100 мкг/мл после 12 ч инкубации. Расположение маркеров указано стрелками.

клеток фибробластов эмбрионов кур нарушается биосинтез клеточных макромолекул. В наибольшей степени повреждается синтез клеточных РНК и в значительно меньшей степени синтез ДНК и белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Witkowski J. T., Robins R. K., Khare G. P. et al. — «J. med. Chem.», 1972, v. 15, p. 1150—1154. — 2. Streeter D., Sidwell R. W. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1973, v. 70, p. 1161—1170. — 3. Sidwell R. W., Huffman T. H., Khare G. P. et al. — «Science», 1972, v. 177, p. 705—706. — 4. Sidwell R. W., Allen L. B., Huffman T. H. et al. — «Chemotherapy», 1973, v. 19, p. 325—340. — 5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265—275.

Поступила 15/XII 1976 г.

EFFECT OF 1-D-RIBOFURANOSYL-1, 2, 4-TRIAZOL-3-CARBOXAMIDE ON THE SYNTHESIS OF CELLULAR MACROMOLECULES IN CELL CULTURE

N. L. Pushkarshaya, V. V. Dikiy, G. A. Galegov

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Ribovirine (1-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamide) possesses the distinct antiviral action against many strains of RNA- and DNA-containing viruses. Data on the effect of ribovirine on the synthesis of cellular macromolecules are presented. After treatment with ribovirine the synthesis of cellular RNA was inhibited by 80-85%. The synthesis of DNA and proteins was decreased less distinctly. The experiments were carried out using the primary tryptic-treated culture of fibroblasts from chicken embryos.

УДК 616.153.1:577.152.231-053.31

*А. А. Никифорова, А. М. Чистякова, И. И. Матвеев,
Н. П. Терюкова, О. П. Архипов, А. И. Клиорин, А. Н. Климов*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ЛЕЦИТИН-ХОЛЕСТЕРИН-АЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ В КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ. СОПОСТАВЛЕНИЕ ЭСТЕРИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ НОВОРОЖДЕННОГО И МАТЕРИ-РОЖЕНИЦЫ

Лаборатория липидного обмена Института экспериментальной медицины АМН СССР и кафедре детских болезней Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Ленинград

В специально подобранной системе липопротеиды — инфранатант, компоненты которой выделены ультрацентрифугированием в плотности 1,21 при 40 000 об/мин в течение 20 ч из плазмы новорожденного и матери-роженицы, показано снижение скорости эстерификации холестерина в пуповинной крови. Выяснено, что это снижение обусловлено недостатком лецитин-холестерин-ацилтрансферазы и изменением состава субстратных липопротеидов (липопротеидов высокой плотности).

Наращение содержания эфиров холестерина в сыворотке крови при инкубации последней в течение 24—48 ч при температуре 37°C было обнаружено Сперри еще в 1935 г. [1]. Однако механизм реакции эстерификации, состоящий в переносе ацильной группы из β -положения лецитина на гидроксил холестерина, был раскрыт Гломсетом лишь в 1962 г. [2]. Фермент, осуществляющий эту реакцию, был назван им лецитин-холестерин-ацилтрансферазой (ЛХАТ). Установлено, что основная масса эфиров холестерина плазмы крови человека (свыше 90%) образуется в сосудистом русле с помощью этого фермента [3] и всего лишь около 10% — в стенке кишечника [4]. Синтез ЛХАТ происходит в печени [5]. Однако активность этого фермента в плазме значительно превышает его активность в печени. Это дает основание предположить, что ЛХАТ синтезируется и находится в печени в неактивированной форме. Субстратом реакции являются неэстерифицированный холестерин и лецитин липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), с которыми ЛХАТ в сосудистом русле образует субстрат-ферментный комплекс [3, 6]. Характерно, что кофакторы ЛХАТ-реакции находятся в составе самого субстрата (ЛПВП) и относятся к категории аполипопротеидов. Ими являются апо- A_1 , апо- C_1 и, возможно, апо- D . В последние годы интерес к ЛХАТ возрос в связи с тем, что было показано участие этого фермента в образовании [7, 8] и катаболизме [9, 10] липопротеидов, а также в гомеостазе холестерина клеточных мембран [11, 12]. Известные в литературе состояния ЛХАТ-дефицита — наследственная ЛХАТ-недостаточность и некоторые заболевания печени с поражением ее паренхимы (инфекционный гепатит, цирроз) — характеризуются снижением активности этого фермента в плазме крови. Наряду с этим при недостаточности ЛХАТ отмечаются значительные изменения со стороны липидов плазмы крови (увеличение количества неэстерифицированного холестерина, уменьшение содержания эфиров холестерина), выраженные изме-

нения липидного и апопротеинового состава всех классов липопротеидов и особенно ЛПВП, накопление неэстерифицированного холестерина в тканях, в том числе в мембране эритроцитов [13—17]. В первых наших исследованиях при сравнительном изучении содержания холестерина в эритроцитах новорожденного и матери было обнаружено накопление его в эритроцитах новорожденного [18]. Эти результаты хорошо согласуются с данными [19], в которых сравнивали содержание холестерина в эритроцитах новорожденных и взрослых. Мы предположили, что накопление холестерина в эритроцитах новорожденных является следствием ЛХАТ-недостаточности у последних. Купер и Гульбрансен показали, что активность этого фермента в пуповинной крови действительно ниже, чем в плазме крови здоровых людей [20]. В связи с этим представлялось интересным сопоставить эстерифицирующую активность плазмы крови новорожденного и матери, выявить причины снижения активности ЛХАТ в плазме крови новорожденного и установить, имеются ли изменения липидов и липопротеидов (в первую очередь ЛПВП) в пуповинной крови, что наряду со снижением активности фермента и накоплением холестерина в эритроцитах новорожденных могло бы свидетельствовать в пользу возможной ЛХАТ-недостаточности у последних.

В данном сообщении представлены результаты по изучению скорости эстерификации холестерина в пуповинной крови, а также в крови матери-роженницы в опытах *in vitro* в специально подобранной системе липопротеиды — инфранатант, позволяющей отдифференцировать влияние энзима от влияния субстрата на процесс эстерификации. Наряду с исследованием активности ЛХАТ мы определяли содержание свободного холестерина и эфиров холестерина в α -липопротеидах новорожденного и матери.

Методика

Кровь из пуповины и вены матери-роженницы брали с использованием в качестве антикоагулянта K_2 -ЭДТА (2 мг на 1 мл крови) и немедленно помещали в гранулированный лед. Плазму отделяли центрифугированием при 2000 об/мин и температуре 4°C.

Активность ЛХАТ определяли в системе липопротеиды — инфранатант [21] в нашей модификации. Преимущества этой системы состоят в том, что, во-первых, как уже указывалось, она позволяет отдифференцировать влияние субстрата от влияния фермента на процесс эстерификации холестерина и, во-вторых, в ней используются нативные, не измененные нагреванием липопротеиды в отличие от метода, предложенного Гломсетом [22]. Общую фракцию липопротеидов и инфранатант получали препаративным ультрацентрифугированием в плотности 1,21 при 40 000 об/мин в течение 22 ч в угловом роторе 40,3 при температуре 4°C на ультрацентрифуге «Spinco» L2-65. Инфранатант диализовали в течение 18 ч против 0,01 М калий-фосфатного буфера с 0,001 М ЭДТА. Липопротеиды промывали еще раз центрифугированием в плотности 1,21 при тех же условиях в течение 22 ч с последующим диализом против такого же буфера. В инфранатанте определяли содержание белка по Лоури [23]. Инфранатант матери разводили таким образом, чтобы содержание белка в нем было таким же, как и в инфранатанте новорожденного.

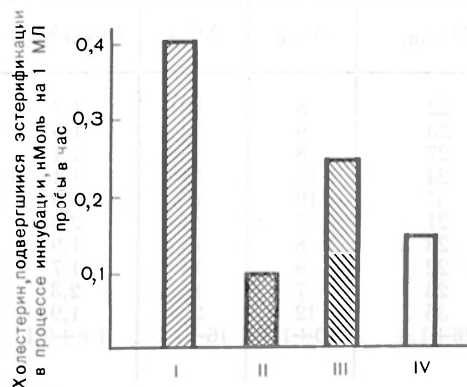
В отличие от метода [21], в котором о степени эстерификации холестерина судят по накоплению его немеченых эфиров в системе за 24 ч инкубации, мы использовали меченные по ^{14}C -холестерину липопротеиды и определяли количество меченых эфиров холестерина, образовавшихся при инкубации меченых липопротеидов с инфранатантом в течение 4 ч инкубации. Меченные по ^{14}C -холестерину липопротеиды получали в опытах *in vitro* [24], причем меченый холестерин добавляли к липопротеидам с таким расчетом, чтобы удельная радиоактивность липопротеидов новорожденного и матери была одинаковой. Для сопоставления скорости ЛХАТ реакции у новорожденного и матери использовали системы липопротеиды новорожденного — инфранатант новорожденного и липопротеиды матери — инфранатант матери. Для выяснения причин снижения эстерифицирующей активности в плазме крови новорожденных были поставлены перекрестные опыты с системами липопротеиды новорожденного — инфранатант матери и липопротеиды матери — инфранатант новорожденного. Состав инкубационной смеси в системе липопротеиды — инфранатант был следующий: 0,1 мл липопротеидов матери или новорожденного; 0,9 мл инфранатанта и 0,5 мл 0,01 М К-фосфатного буфера (рН 7,4). Общий объем пробы составлял 1,5 мл. Контролем служили пробы, где вместо инфранатанта добавляли 0,01 М К-фосфатный буфер. Пробу инкубировали в течение 4 ч при 37°C и постоянном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением к пробам хлороформ-метаноловой смеси 2:1 (по объему). Для экстракции липидов использовали методику, предложенную Брэгдоном [25]. Липиды разделяли по общепринятой методике с помощью тонкослойной хроматографии. Радиоактивность фрак-

ции эфиров холестерина измеряли в сцинтилляционном счетчике «Unilux» III фирмы «Nuclear» «Chicago». Содержание общего холестерина во фракции липопротеидов определяли на автоанализаторе АА-2 фирмы «Техникон». Неэстерифицированный холестерин осаждали дигитонином [26]. Измеряли уровень α -липопротеидного холестерина в супернатанте после осаждения β - и пре- β -липопротеидов [27] также с помощью автоанализатора. Неэстерифицированный холестерин α -липопротеидов в супернатанте определяли дигитониновым методом [26].

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены данные по эстерификации холестерина в системе липопротеиды — инфранатант. Следует подчеркнуть, что концентрация неэстерифицированного холестерина в липопротеидах новорожденного и матери во всех пробах была одинаковой и составляла 0,4 мкмоль/мл. Как следует из рисунка, скорость эстерификации холестерина в системе липопротеиды — инфранатант у новорожденного (II) в 4 раза ниже, чем в такой же системе матери (I). Эти данные свидетельствуют о значительном снижении скорости ЛХАТ-реакции в пуповинной крови, где она составляет 25% от таковой у матери. Наши результаты хорошо согласуются с данными Купера и Гульбрансена [20]. В их опытах активность ЛХАТ в пуповинной крови составляет 38% от таковой у взрослых. Авторы исследовали эстерифицирующую активность в системе, где источником фермента была нативная плазма, а субстратом — инактивированная нагреванием плазма с соотношением фермент — субстрат 1 : 1. Применение подобной системы не позволяет ответить на вопрос о том, с чем связано снижение скорости эстерификации холестерина в пуповинной крови: с ферментом или с субстратом. Упомянутые выше авторы предположили, что причиной снижения эстерифицирующей активности плазмы крови новорожденных является уменьшение концентрации ЛХАТ. Однако прямых экспериментальных доказательств этого предположения не приводится.

Другие авторы [28, 29] также обнаружили, что эстерифицирующая активность в пуповинной крови составляет 45% таковой у взрослых. Следует отметить, что и здесь эстерифицирующая активность определялась в нативной плазме, содержащей как фермент, так и субстрат реакции эстерификации, и, следовательно, как и в предыдущей работе [20], не производилось разграничения влияния фермента от влияния субстрата на этот процесс. Однако, обнаружив снижение скорости ЛХАТ-реакции в крови новорожденных, авторы [28, 29] делают заключение, что скорость эстерификации холестерина в пуповинной крови выше, чем в крови взрослого человека, ввиду относительного преобладания в пуповинной крови концентрации фермента над концентрацией субстрата (содержание ЛХАТ в пуповинной крови снижено примерно в 2 раза, а содержание неэстерифицированного холестерина в 3 раза по сравнению с кровью взрослого человека). Такое заключение авторов основывается лишь на учете количественной взаимосвязи фермента и субстрата и не учитывает возможности того, что качественно фермент и субстрат (ЛПВП) в крови новорожденных могут отличаться от таковых в крови взрослого человека.



Эстерификация ^{14}C -холестерина в системе липопротеиды — инфранатант (средние данные 4 опытов).

I — фермент матери и липопротеиды матери; II — фермент новорожденного и липопротеиды новорожденного; III — фермент матери и липопротеиды новорожденного; IV — фермент новорожденного и липопротеиды матери.

Постановка перекрестных опытов липопротеиды матери — инфранатант новорожденного и инфранатант новорожденного — липопротеиды матери позволила нам выяснить причины снижения эстерифицирующей активности плазмы крови новорожденных. Из рисунка видно, что скорость ЛХАТ-реакции в системе инфранатант новорожденного — липопротеиды матери (IV) в 2,5 раза ниже, чем в системе липопротеиды матери — инфранатант матери (I). Это свидетельствует, скорее всего, о недостатке фермента в плазме крови новорожденных, возможно, вследствие торможения его синтеза или о наличии конформационных изменений, препятствующих взаимо-

Содержание холестерина ЛПВП в плазме крови новорожденного и матери в мг%

Новорожденный				Мать			
ХС _{общ}	ХС _{св}	ХС _{эф}	ХС _{эф} /ХС _{св}	ХС _{св}	ХС _{св}	ХС _{эф}	ХС _{эф} /ХС _{св}
22	8	14	1,7	65	17	48	2,3
23	9	14	1,5	67	17	50	2,9
27	8	19	2,4	60	13	47	3,6
24	10	14	1,4	75	24	51	2,1
37	19	18	0,9	87	26	62	2,3
21	7	14	2,0	67	17	50	2,9
23	8	15	1,9	58	12	46	3,8
22	8	14	1,7	50	10	40	4,0
26	7	19	2,3	32	10	22	2,2
35	12	23	1,9				
26±1,8	10±1,1	16±1,0	1,8±0,1	63±5,1	16±1,9	47±3,5	2,9±0,2

П р и м е ч а н и е. ХС_{общ} — общий холестерин; ХС_{св} — свободный (неэстерифицированный) холестерин; Х_{эф} — эфирсвязанный холестерин.

действию фермента с липопротеидами матери. В данном случае нельзя, по-видимому, говорить о снижении активности фермента из-за возможного недостатка кофакторов реакции эстерификации холестерина у новорожденных, так как липопротеиды матери содержат весь набор апопротеинов, являющихся коэнзимами ЛХАТ-реакции (апо-А₁, апо-С₁, апо-Д). В то же время более низкая скорость эстерификации холестерина в системе инфранатант матери — липопротеиды новорожденного (III) при условии одинаковой концентрации неэстерифицированного холестерина в липопротеидах матери и новорожденного свидетельствует о наличии каких-то структурных изменений в липопротеидах новорожденного, что делает последние менее благоприятным субстратом для ЛХАТ-реакции, чем липопротеиды матери. Поскольку в системе использовалась суммарная фракция липопротеидов, а субстратом ЛХАТ-реакции, как известно, являются ЛПВП, было решено прежде всего выяснить, имеются ли изменения в химическом составе этого класса липопротеидов у новорожденных. В предварительных опытах определили содержание свободного и эфирсвязанного холестерина α -липопротеидов (ЛПВП) новорожденного и матери (см. таблицу). Оказалось, что отношение эфирсвязанного и свободного холестерина в α -липопротеидах новорожденного в 1,6 раза ниже, чем в α -липопротеидах матери, что свидетельствует о снижении эстерификации холестерина в ЛПВП новорожденного.

Таким образом, ЛПВП новорожденного содержат свободного (неэстерифицированного) холестерина больше, чем ЛПВП матери. Учитывая этот факт, а также данные о том, что в липопротеидном спектре новорожденных доля ЛПВП выше, чем у матери [30], в опытах липопротеиды — инфранатант при одинаковой концентрации неэстерифицированного холестерина количество субстратных липопротеидов в общей фракции липопротеидов новорожденного было даже выше, чем в липопротеидах матери. Поэтому не могло быть и речи о недостатке субстрата в опытах, где исполь-

зовались липопротеиды новорожденного. Это еще раз свидетельствует о наличии изменений химического состава субстратных липопротеидов как липидного, так, по-видимому, и апопротеинового. В первую очередь это касается тех апопротеинов, которые выполняют в отношении ЛХАТ-реакции коферментную роль.

Полученные в целом данные свидетельствуют о значительном снижении скорости ЛХАТ-реакции в пуповинной крови, обусловленном уменьшением концентрации фермента и изменением состава ЛПВП новорожденных. Обнаруженные нами снижение содержания эстерифицированного холестерина в ЛПВП новорожденных, уменьшение скорости ЛХАТ-реакции в плазме их крови, а также установленное ранее накопление холестерина в эритроцитах новорожденных, по всей вероятности, — результат ЛХАТ-недостаточности у последних. Так как следствием ЛХАТ-недостаточности являются значительные изменения в химическом составе липопротеидов, то предметом следующего нашего сообщения будет более полное изучение липидного и апопротеинового состава липопротеидов новорожденных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sperry W. M. — «J. biol. Chem.», 1935, v. 11, p. 467. — 2. Glomset J. A., Parker F. et al. — «Biochim. biophys. Acta», 1962, v. 58, p. 398. — 3. Glomset J. A. — «J. Lipid. Res.», 1968, v. 9, p. 155. — 4. Norum K. R., Gjone E. — «Biochim. biophys. Acta», 1967, v. 144, p. 698. — 5. Simon J. B., Boyer J. L. — Ibid., 1970, v. 218, p. 549. — 6. Glomset J. A., Norum K. R. — «Advanc. Lipid Res.», 1973, v. 11, p. 1. — 7. Hamilton R. L., Williams M. C., Havel R. L. et al. — In: Atherosclerosis. Proceedings of the 3d international Symposium. West Berlin, 1973, p. 936. — 8. Hamilton R. L., Kayden H. J. — In: The Liver: Normal and Abnormal Function. New York, 1974, p. 532. — 9. Glomset J. A., Norum K. R., Nichols A. V. et al. — «Scand. J. clin. Lab. Invest.», 1975, v. 35, p. 31. — 10. Norum K. R., Glomset J. A., Nichols A. V. et al. — Ibid., p. 31. — 11. Gjone E. — Ibid., 1974, v. 33, p. 73. — 12. Gjone E., Norum K. R. — «Acta med. scand.», 1970, v. 187, p. 153. — 13. Norum K. R., Gjone E. — «Biochim. biophys. Acta», 1967, v. 144, p. 698. — 14. Glomset J. A., Norum K. R., King W. — «J. clin. Invest.», 1970, v. 49, p. 1827. — 15. Gjone E., Skarbovik A. et al. — «Scand. J. clin. Lab. Invest.», 1974, v. 33, p. 101. — 16. Norum K. R., Gjone E. — Ibid., 1968, v. 22, p. 94. — 17. Fredrickson D. S., Gotto A. M., Levy R. J. — In: The Metabolic Basis in Inherited Diseases. New York, 1972, p. 493. — 18. Климов А. Н., Маграчева Е. Я. — «Вопр. мед. химии», 1976, т. 22, с. 346. — 19. Growley J., Ways P., Jones J. W. — «J. clin. Invest.», 1965, v. 44, p. 989. — 20. Cooper R. A., Gulbransen C. L. — «J. Lab. clin. Med.», 1971, v. 78, p. 323. — 21. Raz A., Kummerow F. A., Nishida I. T. — «Biochim. biophys. Acta», 1969, v. 176, p. 591. — 22. Glomset J. A., Wright J. L. — Ibid., 1964, v. 89, p. 266. — 23. Lowry O. H., Rosebrough N. J. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 24. Whereat A. F., Saple F. — «Arch. Biochem.», 1960, v. 90, p. 224. — 25. Bragdon S. H., Sunderman F. C., Sunderman C. — In: Lipid and Steroid Hormones in Clinical Medicine. Philadelphia, 1960, p. 7. — 26. Zlatkis A. B., Zak B., Boyle A. J. — «J. Lab. clin. Med.», 1953, v. 41, p. 486. — 27. Burstein M., Samaille J. — «Clin. chim. Acta», 1960, v. 5, p. 609. — 28. Lacks G. A., Rutenberg H. L., Soloff L. A. — «Lipids», 1972, v. 7, p. 427. — 29. Frohlich J., Bernstein V., Bernstein M. — «Clin. chim. Acta», 1975, p. 79. — 30. Russ E. M., Eder H. A., Barr D. P. — «J. clin. Invest.», 1954, v. 33, p. 1662.

Поступила 27/XII 1976 г.

RELATIVE INSUFFICIENCY IN THE LECITHIN-CHOLESTEROL-ACETYL TRANSFERASE ACTIVITY IN BLOOD OF NEWBORN CHILDREN. CORRELATION BETWEEN THE ESTERIFICATION ACTIVITY IN BLOOD PLASMA OF NEWBORNS AND OF THEIR MOTHERS

A. A. Nikiforova, A. M. Chistyakova, I. I. Matveev, N. P. Teryukova, O. P. Arkhipov, A. I. Kliorin, A. N. Klimov

Laboratory of Lipid Metabolism, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Chair of Pediatrics, S. M. Kirov Military-Medical Academy, Leningrad

On the basis of data obtained in studies on the accumulation of cholesterol in erythrocytes of newborns, the hypothesis is advanced on the deficiency of lecithin-cholesterol-acetyl transferase (LCAT) in the newborn children. A decrease in the rate of the LCAT-reaction was

shown in funic blood using the specially developed system «LP-infranatante», the constituents of which were isolated from blood plasma of both newborns and of their mothers by ultracentrifugation at a density 1.21 g/ml and 40.000 rpm. The following factors were considered as possible determinants of the decrease in the rate of cholesterol esterification in blood plasma of newborns: 1) insufficiency in LCAT, 2) alteration in the composition of the substrate lipoproteins (lipoproteins of high density).

УДК 577.152.261.087.5

Л. Н. Делекторская

О ВЫБОРЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

I Московский медицинский институт им. И. М. Сеченова

Исследовали условия измерения активности аспартат-аминотрансферазы, позволяющие получить наиболее достоверные результаты. Измерение активности фермента при применении концентраций реактивов, приближающихся к оптимальным (так называемые оптимизированные тесты), позволяет выявить активность на 30—40% выше, чем в субоптимизированных тестах. Вид буфера не оказывает существенного влияния на активность фермента. Предынкубация исследуемого материала с пиридоксальфосфатом в конечной концентрации 0,1 ммоль/л в оптимизированном тесте с применением фосфатного буфера давала активацию от 9,9 до 53,3%.

Аспартат-аминотрансфераза (АсАТ) (КФ 2.6.1.1 — L-аспартат : 2-оксоголутарат-аминотрансфераза) содержится во всех до сих пор исследованных тканях животных и человека. При определении активности фермента в сыворотке или тканях для получения объективной информации важным является достоверность результатов. Практика показывает, что результаты, полученные в процессе определения активности, не всегда оказываются

Т а б л и ц а 1

Рекомендации национальных и международных организаций для определения активности АсАТ (конечная концентрация в тесте)

Условия измерения активности	США, 1961 г.	Англия, 1972 г.	ФРГ, 1972 г.	Скандинав- ский комитет, 1974 г.	Комитет стандартов МФКХ, 1975 г.
Температура, °C	25	25	25	37	30
Буфер	Фосфат- ный	Фосфат- ный	Фосфат- ный	Трис/ЭДТА	Трис
Концентрация буфера, ммоль/л	50	80	80	20	80
pH	7,4	7,4	7,4	7,7	7,8
L-аспартат, ммоль/л	33	125	200	200	200
α-Кетоглутарат, ммоль/л	6,7	6,7	12	12	12
НАДН ₂ , ммоль/л	0,16	0,24	0,18	0,15	0,18
Малатдегидрогеназа, мкмоль/(с·л)	1,0	2,8	10	10	10
Лактатдегидрогеназа, мкмоль/(с·л)	—	—	20	3	15
Пиридоксальфосфат, ммоль/л	—	—	—	—	0,1

правильным [1]. В последние годы в целях получения сравнимых и достоверных результатов специальные международные и национальные комиссии проводят работу по выбору наиболее оптимальных систем определения активности АсАТ. Это может быть достигнуто выбором метода, дающего наиболее правильные аналитические результаты и позволяющего определять максимальную активность фермента. По определению Международной федерации клинической химии (МФКХ) [2], такие методы относятся к ре-

ферентным и могут быть использованы для оценки аналитических качеств других методов. В табл. 1 представлены разработанные рекомендации для определения активности АсАТ комиссиями по ферментам США [3], ФРГ, [4], Англии [5], Скандинавских стран [6] и Комитета стандартов МФКХ [7]. Во всех рекомендациях предлагается реакция, основанная на методе Кармена (UV-тест) [8], модифицированном различными способами. Эта система имеет следующие преимущества: линейность реакции; постоянное устранение из реакционной смеси щавелевоуксусной кислоты, являющейся ингибитором реакции; высокая чувствительность; возможность прямого спектрофотометрического измерения [9]. Различия в рекомендациях касаются выбора температуры и концентрации реактивов. Предлагается работать при температуре 25, 30 и 37°C. Комитет стандартов МФКХ рекомендует проводить измерения при 30°C. За исключением метода МФКХ, ни в одном предложении не применяется пиридоксальфосфат. Это один из самых спорных моментов метода. Пиридоксальфосфат необходим для АсАТ как кофактор для превращения апофермента в активную форму.

До настоящего времени остается несогласованным выбор наиболее оптимального варианта метода определения активности АсАТ. Целью данной работы было сравнение различных условий измерения активности АсАТ с учетом национальных и международных рекомендаций, а также выяснение влияния пиридоксальфосфата на активность фермента.

М е т о д и к а

Для выбора оптимальных условий измерения мы сравнивали три варианта метода Кармена. Использовали реактивы фирмы «Boehringer» (ФРГ) с применением фосфатного буфера и две концентрации L-аспартата и α -кетоглутарата — оптимальной и субоптимальной [10], а также реактивы фирмы «Smith Kline Instruments» (США) в оптимальной концентрации с применением трис-буфера (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Используемые варианты методов (конечная концентрация в тесте)

Условия измерения активности	Субоптимизированный тест	Оптимизированный тест	Оптимизированный тест
Температура реакции, °C	30	30	30
Буфер	Фосфатный	Фосфатный	Трис
Концентрация буфера, ммоль/л	80	80	80
pH	7,4	7,4	7,5
L-аспартат, ммоль/л	33,0	200	200
α -Кетоглутарат, ммоль/л	6,7	12	12
НАДН ₂ , ммоль/л	0,18	0,18	0,18
Малатдегидрогеназа, мкмоль/(с·л)	10	10	10
Лактатдегидрогеназа, мкмоль/(с·л)	20	20	15
Пиридоксальфосфат, ммоль/л	—	—	—

Для устранения мешающего влияния эндогенного пирувата и дегидрогеназ во всех случаях в реакционную смесь добавляли лактатдегидрогеназу (ЛДГ), обеспечивающую быстрый распад кетокислот.

Кинетическое измерение активности проводили на центрифужном анализаторе «Rotachem II» (фирмы «Aminco», США) при 30°C. Реактивы и исследуемый материал разливали в 14-куветный ротор с помощью дозатора, энзиматическая реакция начинается немедленно после смешивания реактивов и исследуемого материала при вращении. При наличии в реакционной смеси ЛДГ неспецифические реакции заканчиваются быстро, в течение 1 мин [11].

Второй этап реакции — период устойчивой концентрации реактивов, в течение которого реакция обычно следует кинетике нулевого порядка и в большинстве случаев линейна. Измерение скорости реакции происходит в этот период через каждые 15 с по 8 точкам в течение 2 мин. С помощью миникомпьютера РДР-8, встроенного в прибор, результаты преобразуются в международные единицы.

Общий объем исследуемой реакционной смеси 500 мкл, объем сыворотки 50 мкл, линейная зависимость до 200 МЕ. Воспроизводимость результатов, выраженная в коэф-

коэффициенте вариации (V), как внутри ротора, так и между роторами была удовлетворительной: $V = 1,1-5,3\%$ (табл. 3).

Исследование проводили с сыворотками больных с нормальной и повышенной активностью фермента, а также с контрольными сыворотками фирмы «Hyland» (США).

Результаты и обсуждение

Сравнительные данные представлены в табл. 4. Результаты, полученные в оптимизированных тестах с применением фосфатного буфера, приняты за 100%. Полученные результаты подтвердили имеющиеся в литературе данные, что на активность АсАТ в значительной степени влияет концентрация L-аспартата и α -кетоглутарата [4, 10]. Увеличение концентрации L-аспартата с 33 до 200 ммоль/л и α -кетоглутарата с 6,7 до 12 ммоль/л дало увеличение активности на 30-40%.

Таблица 3
Воспроизводимость результатов кинетического исследования активности АсАТ ($n=20$)

Статистический показатель	Нормальная величина активности, МЕ		Повышенная величина активности, МЕ	
	внутри ротора	между роторами	внутри ротора	между роторами
\bar{x}	8,7	7,9	11,8	29,4
S	0,1	3,4	0,3	1,5
$V, \%$	1,1	4,3	3,1	5,3

Изменение фосфатного буфера (рН 7,4) на трис-буфер (рН 7,5) при прочих одинаковых условиях не дало существенного изменения активности (95-99,1% по отношению к активности в фосфатном буфере). При тех же условиях измерения на контрольных сыворотках и сыворотках больных проводили определение активности АсАТ с добавлением

пиридоксальфосфата в конечной концентрации 0,1 ммоль/л с предыдущей в течение 10 мин.

В литературе имеются противоречивые данные относительно влияния пиридоксальфосфата на активность фермента. По данным ряда авторов, добавление пиридоксальфосфата в реакционную смесь не оказывает существенного влияния на активность фермента [12]; другие авторы считают, что активность фермента увеличивается на 6-17% [13]; имеются работы, в которых показано значительное увеличение активности фермента (на 40-50%) при добавлении пиридоксальфосфата [9, 14].

Таблица 4
Результаты, полученные при применении трех вариантов метода Кармена (приведены средние результаты из 10 определений на контрольной сыворотке)

Реактив	Активность, МЕ ($\bar{x} \pm S$)	Активность по отношению к I, %	Активность, МЕ ($\bar{x} \pm S$)	Активность по отношению к I, %
Оптимизированный тест фосфатный буфер (I)	62,9 \pm 3,1	100	180,0 \pm 5,2	100
Оптимизированный тест трис-буфер (II)	59,5 \pm 2,9	95	178,5 \pm 3,6	99,1
Субоптимизированный тест	35,7 \pm 1,6	57	127,3 \pm 4,3	70

В наших опытах на контрольных сыворотках активация наблюдалась во всех вариантах метода (табл. 5).

Процент активации зависел от концентрации L-аспартата и α -кетоглутарата. При возрастании концентрации L-аспартата с 33 до 200 ммоль/л и α -кетоглутарата с 6,7 до 12 ммоль/л процент активации снижался с 33 до 7,3. Средний процент активации в сыворотках с повышенной актив-

ностью возрастал с 33 до 37 в субоптимизированном тесте и с 7,3 до 13 в оптимизированном тесте, причем при применении трис-буфера активация при

Т а б л и ц а 5

Увеличение активности АсАТ при предынкубации с пиридоксальфосфатом (приведены средние данные из 10 определений)

Концентрация реактивов, ммоль/л	Активность, МЕ ($\bar{x} \pm S$)	% активации	Активность, МЕ ($\bar{x} \pm S$)	% активации
L-аспартат — 33 α -Кетоглутарат — 6,7 Фосфатный буфер	35,7 \pm 1,6	33	127,3 \pm 4,3	37
L-аспартат — 45,0 α -Кетоглутарат — 9,0 Фосфатный буфер	58,0 \pm 2,9	15	154,2 \pm 3,5	17
L-аспартат — 200,0 α -Кетоглутарат — 12,0 Фосфатный буфер	62,9 \pm 3,1	7,3	180,0 \pm 5,2	13
Трис-буфер	59,5 \pm 2,9	20	178,5 \pm 4,9	19,8

добавлении пиридоксальфосфата была несколько выше (20%), чем при применении фосфатного буфера (7,3%). В сыворотках больных с нормальной и патологической активностью активация при добавлении пиридоксальфосфата колебалась от 9,9 до 53,3% (табл. 6).

Т а б л и ц а 6

Эффект от предынкубации сыворотки больных с пиридоксальфосфатом (оптимизированный тест, фосфатный буфер)

Активность АсАТ, МЕ	Активность АсАТ после предынкубации с пиридок- сальфосфатом, МЕ	% активации
71,4	78,5	9,9
74,5	83,3	11,8
27,3	32,1	17,5
17,8	27,3	53,3
32,1	35,7	11,2
35,2	47,6	36,0
20,2	29,7	47,0
23,8	27,3	14,0
17,8	21,4	20,0
15,4	20,2	31,1
17,8	20,2	13,5
17,8	26,1	46

Анализ данных литературы, а также полученные при исследовании результаты позволяют сделать вывод, что одним из условий выявления максимальной активности АсАТ и получения достоверных результатов является применение оптимальных концентраций реактивов с добавлением в реакционную смесь пиридоксальфосфата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bowers G. N. — In: Quality Control in Clinical Chemistry. Transaction of the 6th International Symposium. New York, 1975, v. 441—467. — 2. Brown S. S. — Ibid., p. 417—423. — 3. Friedman M. M., Taylor T. H. — In: Standard Methods of Clinical Chemistry. V. 3. New York, 1961, p. 207—217. — 4. — «Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.», 1972, Bd 10, S. 37. — 5. Wilkinson J. H., Baron D. N., Moss D. W. et al. — «J. clin. Path.», 1972, v. 25, p. 940—944. — 6. — «Scand. J. clin. Lab. Invest.», 1974, v. 33, p. 291—306. — 7. — «Clin. chim. Acta», 1975, v. 61, F—11—F24, following, p. 238. — 8. Karmen A. — «J. clin. Invest.», 1955, v. 34, p. 131. — 9. Bowers G. N. — In: Proceedings of the Second International Symposium on Clinical Enzymology. Chicago, 1975, p. 11. 1—119. — 10. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse. Bd I. Weinheim, 1974, S. 768—775. — 11. Gerhardt W., Melchior J. — «Scand. J. clin. Lab. Invest.», 1973, v. 32, p. 361—369. — 12. Rodgers D. O. — In: Proceedings of the Second International Symposium on Clinical Enzymology. Chicago, 1975, p. 11, 1—119. — 13. Rej R., Fasce C. F. Jr., Vanderlind R. E. — «Clin. Chem.», 1973, v. 19, p. 92. — 14. Lustig V., Pat-ten R. — «Clin. chim. Acta», 1976, v. 69, p. 101—103.

Поступила 1/ХІІ 1976 г.

ON THE CHOOSE OF OPTIMAL CONDITIONS FOR ESTIMATION OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE ACTIVITY

L. N. Delektorskaya

I. M. Sechenov I Medical School, Moscow.

Various systems for estimation of aspartate aminotransferase activity were compare with regard to national and international recommendations. An increase of l-aspartate concentration from 33 mM/l to 200 mM/l and of α -ketoglutarate from 6.7 mM/l to 12 mM/l elevated the enzymatic activity by 30-40%. Addition of pyridoxal phosphate into reaction mixture caused a decrease in the activation from 33% to 7.3%, respectively. The ratio of activation varied from 9.9% to 53.3% in the optimal test using blood serum from patients and phosphate buffer. Thus, one of requirements on evaluation of maximal aspartate aminotransferase activity and on production of reproducible results is application of optimal concentrations of reagents with addition of pyridoxal phosphate into reaction mixture.

УДК 616.13-008.939.629-02:616.839

*Е. А. Базанов, Л. П. Воровьева, Е. Д. Бренер, О. В. Подольская,
В. В. Сучков, Е. Н. Герасимова, Л. Н. Лебедева, К. Н. Ткаченко*

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА КОЛЛАГЕНА СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ ПРИ ИЗМЕНЕНИЯХ ЦЕНТРАЛЬНО-ВЕГЕТАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Институт общей патологии
и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Исследовали содержание солерастворимого и нерастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты, а также концентрацию свободного оксипролина в сыворотке крови кроликов при изменении функционального состояния и выключении вентромедиальных ядер гипоталамуса. Через 5 ч после однократного их раздражения обнаружено снижение содержания солерастворимого и нерастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты, а также увеличение концентрации свободного оксипролина в сыворотке крови экспериментальных кроликов. Через месяц после электрокоагуляции вентромедиальных ядер содержание солерастворимого коллагена в исследуемых отделах аорты, а также нерастворимого коллагена в брюшном отделе аорты было повышенным, а содержание нерастворимого коллагена в грудном отделе аорты было сниженным. Изменение содержания коллагена в сосудистой стенке сопровождалось накоплением в ней триглицеридов. В этих же исследованиях концентрация свободного оксипролина в сыворотке крови подопытных животных была повышена, а концентрация триглицеридов и холестерина оставалась нормальной. Пятикратное раздражение отделов вентромедиальных ядер, оставшихся неповрежденными, через месяц после электрокоагуляции сопровождалось снижением содержания солерастворимого и нерастворимого коллагена и триглицеридов в грудном и брюшном отделах аорты и нарастанием концентрации свободного оксипролина в сыворотке крови при нормальной концентрации в ней триглицеридов и холестерина. Изменения содержания коллагена в сосудистой стенке, как и концентрации свободного оксипролина в крови, после раздражения вентромедиальных ядер были идентичны изменениям, обнаруженным после однократного внутрибрюшинного введения кортизола интактным животным.

В результате многочисленных клинических наблюдений было установлено, что в патогенезе атеросклероза большая роль принадлежит нарушению центрально-вегетативной регуляции [1—3].

В настоящее время накоплено значительное количество данных, свидетельствующих о том, что одним из ранних проявлений атеросклероза являются пролиферация гладкомышечных клеток сосудистой стенки и изменение их физико-химических свойств [4, 5]. Гладкомышечные клетки интимы и меди и принимают непосредственное участие в синтезе основного структурированного белка сосудистой стенки — коллагена [6], количество которого увеличивается с возрастом, достигая наибольших величин (60—80%) в атероматозных бляшках [7]. Кроме того, было установлено, что в местах пролиферации гладких мышц коронарных артерий детей, умерших в возрасте 10—15 лет, накапливаются рыхлая соединительная ткань и коллагеновые волокна [8—10]. На основании морфологических исследований трупного материала сделано заключение, что эти процессы пред-

шествуют отложению липидов. В связи с изложенным выше нас интересовал вопрос о роли изменений нейрогуморальной регуляции в метаболизме коллагена сосудистой стенки. Прежде всего мы сочли целесообразным исследовать особенности обмена коллагена сосудистой ткани при изменении функционального состояния и выключении вентромедиальных ядер гипоталамуса, участвующих в центрально-вегетативной интеграции поведенческих и психоэмоциональных реакций, а также при введении кортизола, являющегося одним из основных гуморальных адаптивных гормонов. Правомочность постановки подобных исследований основывалась на ряде установленных фактов, указывающих на ускорение развития экспериментального алиментарного атеросклероза и нарушений обмена липидов как на фоне изменений гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы (ГГНС), так и гормонального равновесия при повреждении ядерных структур переднемедиального и заднего отделов гипоталамуса [11—13]. Наряду с этим коагуляция ядер гипоталамуса у кроликов без атерогенной диеты не приводила ни к гиперхолестеринемии, ни к гистологически выявляемым повреждениям сосудистой стенки, несмотря на повышенную активность ГГНС [12].

Особый интерес к изучению роли кортизола в обмене коллагена обусловлен также результатами наших предыдущих исследований. Было показано, что у больных коронарным атеросклерозом увеличивалась экскреция 17-оксикортикостероидов и биологически активного кортизола наряду с гипертриглицеридемией и повышением концентрации свободного оксипролина в сыворотке крови, являющегося основным показателем обмена коллагена [14].

М е т о д и к а

Для решения поставленных вопросов были проведены две серии опытов. В I серии (12 животных) на ненаркотизированных кроликах породы шиншилла произвели длительную билатеральную электростимуляцию вентромедиальных ядер гипоталамуса с помощью заранее вживленных электродов (параметры раздражения 50 Гц, 8—12 В, 1,5 мс в течение 4—5 ч).

Во II серии в вентромедиальные ядра гипоталамуса 22 кроликам вживили электроды и 12 из них произвели однократную коагуляцию этих ядер постоянным током (анод 5 мА, 20—25 с). При этом электроды вживляли в передние отделы вентромедиальных ядер, вследствие чего достигалось разрушение лишь части ядра. Через месяц после коагуляции на месте вживления электрода образовывалась соединительнотканная капсула, а в оставшейся части ядра отмечалась повышенная нейросекреторная активность. Спустя месяц после коагуляции 6 из 12 кроликов были забиты, а остальным на протяжении 5 дней производили раздражение части вентромедиальных ядер, оставшейся неповрежденной (4—5 мА, прямоугольные импульсы частотой 100 Гц в течение 1—1½ ч ежедневно). Локализацию очагов поражения в гипоталамусе, морфофункциональное состояние ГГНС на серийных срезах гипоталамуса и атеросклеротический показатель определяли, как описано ранее [12]. В сыворотке крови животных определяли концентрацию свободного оксипролина, холестерина и триглицеридов по описанным ранее методам [14]. В грудном и брюшном отделах аорты исследовали содержание растворимого и нерастворимого коллагена, холестерина и триглицеридов. Выделение общих липидов и фракций коллагена производил и по методам Вейсмана и О'Дела [15, 16]. О содержании каждой фракции в сосудистой стенке судили по количеству оксипролина, определявшемуся по методу Стегемана [17].

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

В I серии опытов через 5 ч после однократного раздражения ядер гипоталамуса в грудном и брюшном отделах аорты было обнаружено снижение содержания растворимого и нерастворимого коллагена (табл. 1). Одновременно увеличивалась концентрация свободного оксипролина в сыворотке крови экспериментальных животных по сравнению с таковой у контрольных ($3,1 \pm 0,12$ мкг/мл при $1,6 \pm 0,10$ мкг/мл в контроле; $P < 0,01$).

Во II серии опытов спустя месяц после коагуляции вентромедиальных ядер содержание растворимого коллагена в брюшном и особенно грудном отделах аорты оказалось повышенным по сравнению с контролем

(табл. 2). Если количество солерастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты изменялось однонаправленно, то в изменении содержания нерастворимого коллагена наблюдалась иная картина: так, в грудном отделе аорты содержание нерастворимого коллагена было снижено, а в брюшном повышено. Изменение содержания коллагена в сосудистой стенке сопровождалось накоплением в ней триглицеридов при нормальном содержании холестерина (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 1

Содержание коллагена (в мкг оксипролина на 100 мг сухой обезжиренной ткани) в аорте и концентрация свободного оксипролина (в мкг/мл) в сыворотке крови кролика через 5 ч после однократного раздражения вентромедиальных ядер гипоталамуса ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Отдел аорты	Контроль	Опыт	P
Солерастворимый коллаген	Грудной	4,14±0,24	2,13±0,25	<0,01
	Брюшной	7,24±0,70	5,82±0,17	<0,01
Нерастворимый коллаген	Грудной	2324±40	1600±60	<0,01
	Брюшной	3720±54	2100±74	<0,01
Свободный оксипролин сыворотки крови		1,6±0,10	3,1±0,12	<0,01

Наряду с нарушением обмена коллагена в сосудистой стенке через месяц после электрокоагуляции вентромедиальных ядер гипоталамуса концентрация свободного оксипролина в сыворотке крови подопытных животных повышалась по сравнению с контролем ($1,8 \pm 0,17$ при $1,2 \pm 0,06$ мкг/мл в контроле; $P < 0,01$). Необходимо подчеркнуть, что в предварительных исследованиях, проведенных через 24 ч после коагуляции, концентрация свободного оксипролина в сыворотке крови экспериментальных животных была повышена по сравнению с контролем ($2,4 \pm 0,18$ при $1,4 \pm 0,13$ мкг/мл; $P < 0,01$).

Т а б л и ц а 2

Содержание коллагена (в мкг оксипролина на 100 мг сухой обезжиренной ткани), холестерина и триглицеридов (в мг на 100 мг сухой обезжиренной ткани) в аорте и концентрация свободного оксипролина (в мкг/мл) в сыворотке крови кролика через месяц после электрокоагуляции вентромедиальных ядер гипоталамуса ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Отдел аорты	Контроль	Опыт	P
Солерастворимый коллаген	Грудной	1,1±0,10	1,9±0,15	<0,001
	Брюшной	2,1±0,26	3,0±0,26	<0,05
Нерастворимый коллаген	Грудной	2500±100	2130±120	<0,05
	Брюшной	5060±180	6120±160	<0,001
Холестерин	Грудной	0,46±0,04	0,48±0,06	>0,05
	Брюшной	0,62±0,01	0,54±0,03	>0,05
Триглицериды	Грудной	1,23±0,06	2,28±0,03	<0,05
	Брюшной	1,86±0,03	7,20±0,03	<0,001
Свободный оксипролин сыворотки крови		1,2±0,06	1,8±0,17	<0,01

Проведенное через месяц после электрокоагуляции пятикратное раздражение отделов вентромедиальных ядер, оставшихся неповрежденными, сопровождалось снижением содержания солерастворимого и нерастворимого коллагена, а также триглицеридов в грудном и брюшном отделах аорты (табл. 3) и нарастанием концентрации свободного оксипролина в сыворотке крови ($2,14 \pm 0,18$ при $1,4 \pm 0,13$ мкг/мл в контроле; $P < 0,01$). В отличие от этого концентрация холестерина и триглицеридов в сыворотке крови экспериментальных животных не отличалась от таковой, обнару-

женной в контроле (соответственно $58 \pm 5,70$ при $40 \pm 7,20$ мг% в контроле; $P > 0,05$ и $75 \pm 6,12$ при $63 \pm 7,11$ мг% в контроле; $P > 0,05$).

Таким образом, были выявлены идентичные изменения в содержании фракций коллагена в грудной и брюшном отделах аорты и в концентрации свободного оксипролина в сыворотке крови как после однократного раздражения вентромедиальных ядер у интактных животных, так и после пятикратного раздражения тех же ядер гипоталамуса спустя месяц после

Т а б л и ц а 3

Содержание коллагена (в мкг оксипролина на 100 мг сухой обезжиренной ткани), холестерина и триглицеридов (в мг на 100 мг сухой обезжиренной ткани) в аорте и концентрация свободного оксипролина (в мкг/мл) в сыворотке крови кролика после пятикратного раздражения вентромедиальных ядер гипоталамуса спустя месяц после их коагуляции ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Отдел аорты	Контроль	Опыт	P
Солерастворимый коллаген	Грудной	$2,0 \pm 0,15$	$0,8 \pm 0,13$	$< 0,001$
	Брюшной	$3,5 \pm 0,28$	$2,6 \pm 0,16$	$< 0,05$
Нерастворимый коллаген	Грудной	2643 ± 168	2014 ± 88	$< 0,05$
	Брюшной	2940 ± 104	2050 ± 126	$< 0,001$
Холестерин	Грудной	$0,48 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,06$	$> 0,05$
	Брюшной	$0,56 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,01$	$> 0,05$
Триглицериды	Грудной	$1,32 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,04$	$< 0,001$
	Брюшной	$2,16 \pm 0,06$	$1,20 \pm 0,05$	$< 0,001$
Свободный оксипролин сыворотки крови		$1,4 \pm 0,13$	$2,1 \pm 0,18$	$< 0,01$

их коагуляции. Эти изменения выражались в снижении содержания солерастворимого и нерастворимого коллагена в сосудистой стенке и увеличении концентрации свободного оксипролина в сыворотке подопытных кроликов по сравнению с контрольными.

Аналогичные изменения были получены нами ранее после однократного внутрибрюшинного введения здоровым кроликам кортизола. Уже через 5 ч после введения гормона наблюдалось снижение содержания солерастворимого и нерастворимого коллагена в грудном отделе аорты (соответственно $5,84 \pm 0,31$ мкг оксипролина на 100 мг сухой обезжиренной ткани при $10,65 \pm 0,80$ мкг в контроле; $P < 0,05$ и 1380 ± 35 мкг оксипролина на 100 мг сухой обезжиренной ткани при $2060 \pm 50,7$ мкг в контроле; $P < 0,001$), а также увеличение концентрации свободного оксипролина в сыворотке крови ($2,02 \pm 0,15$ при $0,65 \pm 0,04$ мкг/мл в контроле; $P < 0,001$). Сниженное содержание солерастворимого и нерастворимого коллагена в стенке аорты, включая брюшной отдел ее, сохранялось в течение 24 ч и нормализовалось лишь через 48 ч после введения гормона. Концентрация свободного оксипролина в сыворотке крови, хотя и снижалась по мере выведения кортизола из организма, тем не менее оставалась повышенной по сравнению с таковой у контрольных животных даже через 48 ч после введения препарата ($0,91 \pm 0,09$ при $0,65 \pm 0,04$ мкг/мл в контроле; $P < 0,05$).

При анализе результатов наших исследований следует иметь в виду, что в литературе имеются данные о влиянии кортизола и его аналогов на содержание коллагена в несосудистой ткани (кожа, кость, хрящ и др.). Показано, что гормон и его аналоги способны, с одной стороны, снижать активность пролингидроксилазы [18], вызывая тем самым подавление синтеза коллагена, а с другой — усиливать катаболизм коллагена, особенно его молодых, вновь синтезированных форм [19—22]. Последнее осуществляется через систему лизосомы — стероиды, которая регулирует распад белков соединительной ткани [23]. При этом в сыворотке крови нарастает уровень оксипролина — аминокислоты, образующейся в ре-

зультате гидроксирования пролина после включения его в полипептидную цепь белка. Эта аминокислота входит главным образом в состав коллагена, является для него специфической и появляется в биологических жидкостях (в крови и моче) только в результате его катаболизма [24].

Сопоставление приведенных выше данных литературы с результатами наших исследований позволяет полагать, что снижение содержания солерастворимого и нерастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты, а также накопление свободного оксипролина в сыворотке крови животных через 5 и 24 ч после введения кортизола обусловлено сходным влиянием гормона на сосудистую и несосудистую соединительную ткань. Поскольку снижение содержания солерастворимого и нерастворимого коллагена в сосудистой стенке, а также увеличение концентрации свободного оксипролина в сыворотке крови имели место как после однократного введения кортизола, так и после раздражения вентромедиальных ядер спустя месяц после их электрокоагуляции, последнее, очевидно, приводило к повышению активности коркового слоя надпочечников с последующим увеличением секреции кортизола.

В связи с этим можно полагать, что нарастание уровня оксипролина в сыворотке крови через сутки после коагуляции вентромедиальных ядер обусловлено теми же изменениями в обмене коллагена сосудистой стенки, которые имели место после раздражения этих же ядер (как однократного, так и пятикратного), поскольку и в том, и в другом случае специальными методами выявлена высокая активность ГГНС.

Однако после однократного введения кортизола восстановление нормального содержания солерастворимого и нерастворимого коллагена в сосудистой стенке (свидетельствующее о нормализации метаболизма коллагена) происходит уже через 48 ч после введения гормона. В отличие от этого через месяц после коагуляции вентромедиальных ядер гипоталамуса накопление солерастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты, а также увеличение содержания нерастворимого коллагена в брюшном отделе и снижение его содержания в грудном отделе аорты свидетельствуют о сформировавшихся стойких нарушениях в обмене коллагена сосудистой ткани.

Увеличение содержания солерастворимого коллагена в соединительной ткани может быть следствием либо усиленного синтеза, либо замедленного созревания коллагена [19—21, 24]. Нарастание содержания солерастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты через месяц после электрокоагуляции вентромедиальных ядер скорее всего свидетельствует об усилении в ней синтеза коллагена, которое обусловлено увеличением активности пролингидроксилазы [25] и вследствие этого ускорением образования оксипролина из пептидносвязанного пролина [26]. Усиление синтеза коллагена связано также с пролиферацией гладкомышечных клеток сосудистой стенки, обеспечивающих внутриклеточную сборку полипептидных цепей коллагена [27]. Показано, что пролиферация гладкомышечных клеток стимулируется некоторыми классами липидов плазмы, проникающих в сосудистую стенку [27]. Так, усиление этого процесса в культуре ткани было обнаружено при увеличении в среде концентрации β -липопротеидов — основной транспортной формы холестерина [28]. Однако в проведенных нами исследованиях накопление солерастворимого (вновь синтезированного) коллагена через месяц после электрокоагуляции вентромедиальных ядер не сопровождалось ни увеличением концентрации холестерина в крови, ни накоплением содержания его в стенке аорты. Вместе с тем содержание триглицеридов было увеличено как в грудном ($2,28 \pm 0,03$ мг на 100 мл сухой обезжиренной ткани при $1,23 \pm 0,06$ мг на 100 мг в контроле), так и в брюшном ($7,20 \pm 0,03$ мг на 100 мг сухой обезжиренной ткани при $1,86 \pm 0,03$ мг/100 мг в контроле) отделах аорты, хотя концентрация триглицеридов в крови оставалась нормальной. Увеличение содержания триглицеридов могло быть обусловлено либо усилением синтеза их в самой

сосудистой стенке, либо увеличением их проникновения из сосудистого русла в составе пре- β -липопротеидов — основной транспортной формы триглицеридов. Последнее предположение представляется более вероятным в свете анализа результатов наших исследований, касающихся изменения содержания коллагена. Нарушение соотношения растворимого и нерастворимого коллагена с преимущественным накоплением первого, вероятно, способствует адсорбции пре- β -липопротеидов за счет связывания их с коллагеном [28] и увеличению содержания триглицеридов в сосудистой стенке через месяц после электрокоагуляции. Вместе с тем нельзя отрицать, что одновременное накопление растворимого коллагена (отражающее ускорение его синтеза) и увеличение содержания триглицеридов в стенке сосудов через месяц после электрокоагуляции могут быть следствием нарушения нейрогуморальной регуляции как обмена коллагена, так и синтеза триглицеридов в сосудистой стенке.

Обращает на себя внимание однонаправленность изменения содержания растворимого коллагена и триглицеридов в сосудистой стенке. Так, содержание каждого из них увеличивалось через месяц после электрокоагуляции венстромедиальных ядер и снижалось вследствие пятикратного раздражения тех же ядер. Это подтверждает наличие тесной связи между обменом коллагена и накоплением триглицеридов в сосудистой стенке.

Второй вопрос, требующий обсуждения, связан с увеличением концентрации оксипролина в сыворотке крови на фоне накопления растворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты через месяц после электрокоагуляции. Накопление оксипролина в сыворотке крови, очевидно, обусловлено усилением распада молодого (незрелого) коллагена, происходящим одновременно с превалирующим увеличением его синтеза. Что касается неодинаковой направленности изменений содержания нерастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты, то она может быть связана как с особенностями структуры и функции этих отделов аорты, так и с различной скоростью катаболизма и созревания в них коллагена.

Таким образом, изменение функционального состояния некоторых структур венстромедиальных ядер гипоталамуса, участвующих в центрально-вегетативной интеграции поведенческих и психоэмоциональных реакций, сопровождаются выраженными изменениями обмена коллагена в сосудистой стенке, приводящим к увеличению концентрации свободного оксипролина в сыворотке крови. При этом направленность изменений содержания коллагена зависит как от характера воздействия на венстромедиальные ядра, так и от особенностей метаболизма коллагена различных отделов аорты (грудного и брюшного) в норме и при патологии.

Согласно одной из современных гипотез о характере и причинах ранних изменений при атеросклерозе, большое значение придается изменению структуры и функции мембран гладкомышечных клеток сосудистой ткани с последующей их гиперплазией. Следствием этого является усиление синтеза коллагена в клетках и увеличение проницаемости их мембран для липопротеидов.

Обнаруженные в настоящем исследовании изменения в обмене коллагена и увеличение содержания триглицеридов в сосудистой стенке, очевидно, являются одним из ранних проявлений нарушения центрально-вегетативной регуляции, предшествующих гиперлипотеидемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ланг Г. Ф. Гипертоническая болезнь. Л., 1950. — 2. Мясников А. Л. Гипертоническая болезнь и атеросклероз. М., 1965. — 3. Пихвацабая И. К. Ишемическая болезнь сердца. М., 1975. — 4. Haupt M. D., Moore R. H., Movat H. L. — «Am. J. Path.», 1960, v. 37, p. 377—383. — 5. Ross R. In: Wissler R. W. — (Ed.) The Pathogenesis of Atherosclerosis. Baltimore, 1972, p. 147—154. — 6. Ross R., Klebanoff S. J. — «J. Cell Biol.», 1971, v. 50, p. 159—171. — 7. Smith E. B., Smith R. H., Paoletti R., Gotto A. M. (Eds). Early Changes in Aortic Intima. Atherosclerosis Reviews. V. 1. New York, 1976, v. 119—136. —

8. Вихерт А. М. — «Кардиология», 1974, № 12, с. 61—66. — 9. Вихерт А. М., Жданов В. С. — «Арх. пат.», 1970, № 7, с. 68—75. — 10. Вихерт А. М., Жданов В. С., Матова Е. Е. — Там же, № 2, с. 44. — 11. Лебедева Л. Н., Кобзева Л. П., Соколова Л. Н. — «Бюлл. exper. биол.», 1974, № 5, с. 65. — 12. Лебедева Л. Н., Ткаченко К. Н., Советов А. М. и др. — Там же, 1975, № 5, с. 23. — 13. Friedman M. — «Am. J. Physiol.», 1972, v. 223, p. 473. — 14. Воробьева Л. П., Базанов Е. А., Сучкова С. Н. и др. — «Кардиология», 1975, № 2, с. 41—46. — 15. Weissman N., Shild G. S., Carnes W. N. — «J. biol. Chem.», 1963, v. 238, p. 3115. — 16. O'Dell B. L., Bird D. W., Rugglis D. L. et al. — «J. Nutr.», 1966, v. 88, p. 9—14. — 17. Stegemann H. — «Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.», 1958, Bd 311, S. 41—45. — 18. Cutroneo K., Costello D., Fuller G. C. — «Biochem. Pharmacol.», 1971, v. 20, p. 2797—2804. — 19. Kivirikko K. J. — «Acta physiol. scand.», 1963, v. 60, Suppl. 219, p. 1—92. — 20. Smith Q. T., Allison D. J. — «Endocrinology», 1965, v. 77, p. 785—791. — 21. Houck J. C., Jacob R. A. — «Proc. exp. Biol. (N. Y.)», 1963, v. 113, p. 692—694. — 22. Reynolds J. J. — In: Dingle T. et al. (Eds) *Lysosomes in Biology and Pathology*. V. 2. Amsterdam, 1973, p. 163—177. — 23. Le Roy E. C., Kaplan A., Udenfriend S. et al. — «J. biol. Chem.», 1964, v. 239, p. 3350—3356. — 24. Sethi P., Ramey E. R., Houck J. C. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)», 1961, v. 108, p. 74—77. — 25. Fuller G. C., Miller E., Farber T. et al. — «Connect. Tissue Res.», 1973, v. 1, p. 217—220. — 26. McCullagh K. G., Erhart L. A. — «Atherosclerosis», 1974, v. 19, p. 13—28. — 27. Parahadjopoulos D. — «J. theor. Biol.», 1973, v. 43, p. 329—335. — 28. Melcher A. H. — «Gerontologia (Basel)», 1969, v. 15, p. 217—232.

Поступила 22/XII 1976 г.

CHARACTERISTICS OF COLLAGEN METABOLISM IN VESSEL WALL UNDER ALTERED CENTRAL-VEGETATIVE REGULATION

E. A. Bazanov, L. P. Vorob'eva, F. D. Brener, O. V. Podol'skaya, V. V. Suchkov, E. N. Gerasimova, L. N. Lebedeva, K. N. Tkachenko.

All-Union Cardilogic Researc Centre, Institute of General Pathology and Pathophysiology Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow.

Content of salt-soluble and insoluble collagen in thoracal and peritoneal parts of aorta as well as concentration of free hydroxyproline in blood serum were studied in rabbits with altered functional state and with electrocoagulated ventromedial nuclei of hypothalamus. Within 5 hrs after single stimulation of ventromedial nuclei of hypothalamus content of salt-soluble and insoluble collagen was decreased in thoracal and peritoneal parts of aorta, at the same time concentration of hydroxyproline was increased in blood serum of experimental rabbits. Contents of salt-soluble collagen in these parts of aorta as well as of insoluble collagen in aorta peritoneal part were increased and content of insoluble collagen in thoracal part was decreased within a month after destruction of ventromedial nuclei. These alterations in collagen content were accompanied by accumulation of triglycerides in vessel wall. At the same experiments concentration of free hydroxyproline was increased in blood serum of the animals and concentrations of triglycerides and cholesterol remained normal.

Five-fold stimulation of the ventromedial nuclei, left intact, was accompanied within a month after treatment by decrease in content of salt-soluble, insoluble collagen and triglycerides in aorta thoracal and peritoneal parts and by increase in concentration of free hydroxyproline in blood serum with maintenance of normal content of triglycerides and cholesterol in the tissue. These alterations in collagen content and in concentration of free hydroxyproline after stimulation of hypothalamus ventromedial nuclei were similar to those observed after single intraperitoneal administration of hydrocortisone into intact animals. Alteration in collagen metabolism as well as increase of triglycerides content in vessel wall within a month after electrocoagulation appear to be one of the early manifestations in impairment of central-vegetative regulation preceding hyperlipoproteinemia.

УДК 612.015.3.014.46

А. Г. Швецкий, Л. М. Воробьева

О ВЛИЯНИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОГЕННЫХ СТИМУЛЯТОРОВ ПЕНТОКСИЛА И МУМИЕ НА НЕКОТОРЫЕ ОБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ

Кафедра общей хирургии и Центральная научно-исследовательская лаборатория Красноярского медицинского института

После десятидневного приема мумие и пентоксила у белых крыс увеличивается относительная масса печени, а также повышается содержание белка, РНК и гликогена в этом органе. Содержание жира снижается. В гомогенатах печени гликолиз с использованием в качестве субстратов гликогена и глюкозо-6-фосфата не изменяется, а при использовании глю-

жозы увеличивается в 2—3 раза. При полярографическом изучении дыхания митохондрий печени обнаруживается отчетливое увеличение дыхательной активности во всех метаболических состояниях, причем с возрастанием дозы препарата выявляется функциональное перенапряжение, приводящее к ингибированию процессов фосфорилирования.

Снижение эффективности антибиотикотерапии, увеличение хронических форм воспаления явились основанием для поисков средств, способных повысить реактивность организма [1]. В связи с этим все большее значение приобретают неспецифические биогенные стимуляторы (НБС): пиримидиновые производные, бактериальные полисахариды, препараты нуклеиновых кислот. В ряду НБС следует рассматривать и мумие — средство народной медицины, получившее в последние годы широкое распространение, но еще не имеющее стандартных лекарственных форм.

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования [2—10] показали, что НБС стимулируют специфические и неспецифические факторы защиты организма, обладают противовоспалительными свойствами и улучшают процессы регенерации.

Биохимический механизм действия НБС изучен недостаточно, что в немалой мере тормозит их широкое клиническое применение. Особенно мало данных о механизме действия мумие [11—16].

Поэтому мы поставили перед собой задачу изучить влияние НБС (пентоксила и саянского мумие) на некоторые обменные процессы.

М е т о д ы

Беспородным крысам-самцам массой 180—220 г на протяжении 10 дней в желудок через зонд ежедневно вводили 2 мл 0,9% NaCl или в таком же объеме взвесь пентоксила 100 мг/кг, или водный раствор саянского мумие, очищенного методом перколяции [17]. Дозы мумие составляли 50, 100 и 500 мг/кг. На 11-й день животных декапитировали и брали органы для биохимического и гистофункционального исследования. Определяли относительную массу печени. Уровень общего и остаточного азота исследовали сжиганием по Кьельдалю с калориметрированием по Фолину [18], белок печени и коэффициент протеолиза вычисляли по формуле [19]; суммарный жир печени определяли гравиметрически после экстракции высушенных до постоянной массы кусочков ткани дихлорэтаном и в аппарате Сокслета; гликоген — по модифицированному методу [20]. Содержание нуклеиновых кислот в печени определяли по Цаневу и Маркову [21]. Гликолитическую активность оценивали по приросту содержания лактата в цельном гомогенате печени. Навеску печени гомогенизировали в растворе 0,25 М сахарозы — 1 мМ ЭДТА; 10 мМ трис-буфера pH 7,4 в соотношении 1 : 4. Гомогенат добавляли в инкубационную среду (15 мМ фосфатный буфер, 50 мМ гистидин, 6 мМ MgCl₂, 3,5 мМ АТФ, 1,8 мМ НАД) из расчета 1—1,5 мг белка на пробу. Белок определяли по Лоури. В качестве субстрата использовали глюкозу, гликоген и глюкозо-6-фосфат по 10 мМ. Концентрацию лактата определяли спектрофотометрически ферментативным методом в присутствии НАД и ЛДГ [22] и выражали в микромолях на 1 мг белка в час или на 1 мг ткани в час.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования. Дыхание изучали полярографически (полярограф LP-7) с применением закрытого платинового электрода типа Кларка [23]. Средой выделения и суспендирования служила 0,3 М сахароза; 10 мМ трис-буфер pH 7,4, 0,5 мМ ЭДТА. Инкубационные среды: сахарозная — 0,29 мМ сахароза, 10 мМ трис-буфер, 5,6 мМ KCl и 3 мМ KН₂PO₄, солевая — 145 мМ NaCl, 5,6 мМ KCl, 10 мМ трис-буфер и 3 мМ KН₂PO₄. Для оценки метаболического состояния митохондрий применяли следующие тесты: V₀ — скорость окисления в среде с субстратом окисления; V₃ — скорость окисления при добавлении АДФ (150 мкМ), V₄ — скорость дыхания после фосфорилирования добавленной АДФ; V_{днф} — скорость дыхания при добавлении ДНФ (40 мкМ); ДК_д — дыхательный контроль по Ларди (V₃/V₀); ДК_ч — дыхательный контроль по Чансу (V₃/V₄). Общий белок сыворотки крови определяли на рефрактометре АBBE, белковые фракции — методом электрофореза на бумаге.

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

Как видно из табл. 1, при введении пентоксила в течение 10 дней увеличивается содержание общего азота в печени и снижается уровень остаточного азота на 16—18%. В результате содержание белка в печени возрастает, а коэффициент протеолиза уменьшается на 1/3. Эти данные совпадают с уже имеющимися [7]. Соответственно наблюдается и достоверное увеличение относительной массы печени.

Под воздействием мумие происходят аналогичные и несколько более выраженные изменения, причем при увеличении дозы мумие показатели практически не изменяются. Полученные данные свидетельствуют о том, что мумие, так же как пиримидиновые производные, оказывает выраженное анаболическое и антикатаболическое действие.

Т а б л и ц а 1

Изменения белкового обмена у интактных крыс под влиянием мумие и пентоксила

Показатели	Контроль	Пентоксил 100 мг/кг	Мумие, мг/кг	
			50	500
Относительная масса печени	3,5±0,022 (21)	3,72±0,063 (10)	3,81±0,049 (41)	3,77±0,039 (38)
Общий азот, мг%	3,51±0,09 (39)	4,06±0,01 (10)	5,03±0,15 (27)	5,10±0,18 (21)
Остаточный азот, мг%	0,22±0,008 (39)	0,18±0,007 (10)	0,15±0,004 (27)	0,135±0,005 (21)
Белок печени	20,53±0,58	24,26±1,17	30,28±1,28	30,99±1,28
Коэффициент протеолиза	6,75±0,19	4,54±0,12	3,17±0,17	2,77±0,09
Общий белок сыворотки, г%	7,38±0,13 (21)		7,69±0,06 (41)	7,66±0,002 (30)
Альбумины, г%	2,75±0,008 (20)		3,11±0,053 (24)	3,05±0,034 (25)
Глобулины:				
α ₁	0,91±0,056		1,03±0,036	0,98±0,05
α ₂	0,91±0,051		0,65±0,053	0,68±0,034
β	1,28±0,066		1,64±0,027	1,68±0,043
γ	1,49±0,096		1,26±0,043	1,27±0,047

П р и м е ч а н и е. Для относительного веса, общего и остаточного азота, белка печени и коэффициента протеолиза $P < 0,01—0,001$, для сыворотки и белковых фракций $P < 0,05—0,001$, кроме α₁, где $P < 0,1$. Здесь и в табл. 2 и 3: в скобках — число крыс.

Одновременно отмечается и повышение белоксинтезирующей функции печени: повышается уровень общего белка в сыворотке крови, в белковых фракциях увеличивается содержание альбуминов и β-глобулинов при снижении содержания α₂-глобулинов на 25%. Остается непонятным снижение уровня γ-глобулинов в сыворотке крови, поскольку гистофункциональные исследования свидетельствуют о высокой активности купферовских клеток печени, а в костном мозге и селезенке значительно увеличивается количество ретикулярных и плазматических клеток. Кроме того, у доноров, принимавших мумие в процессе иммунизации антистафилококковым апатоксином, титры антиальфатоксина нарастают в 2¹/₂—3 раза.

Содержание РНК в печени животных, получавших НБС, достоверно увеличивается (табл. 2), а содержание ДНК не меняется. Эти данные подтверждаются результатами гистофункционального исследования — усилением пиронинофилии гепатоцитов и, очевидно, связаны со снижением активности нуклеаз, так как накопление нуклеотидов в кровеносных органах крыс, получавших мумие, происходило параллельно снижению нуклеазной активности [15].

Данные табл. 3 свидетельствуют, что под влиянием НБС в печени крыс на 12—20% увеличивается содержание гликогена и на 16—20% снижается содержание жира. Последнее свидетельствует о превышении липолиза над липогенезом и подтверждается гистофункциональными исследованиями.

Как видно из табл. 4, пентоксил и мумие изменяют интенсивность гликолиза. При использовании в качестве субстратов гликогена и глюкозо-6-фосфата различие между опытом и контролем недостоверно. В то же время при использовании глюкозы содержание лактата увеличивается в 2—3 раза. Хорошо известно, что при гликолизе в зависимости от субстрата лимитирующим фактором оказываются разные ферменты: при гликогене — фосфоорилаза, при глюкозо-6-фосфате — фосфофруктокиназа, при глюкозе — гексо-

киназа [24]. Активирование гликолиза только при использовании в качестве субстрата глюкозы свидетельствует в пользу того, что пентоксил и мумие активируют гексокиназу.

Наибольший интерес представляют результаты полярографического исследования дыхания митохондрий. Опыты проведены двумя сериями:

Т а б л и ц а 2

Содержание нуклеиновых кислот (в мкг%) в печени intactных крыс под влиянием пентоксила и мумие

Показатель	Контроль	Пентоксил, 100 мг/кг	Мумие, мг/кг		
			50	100	500
РНК	44,46±2,47 (21)	47,32±1,43* (13)	54,00±2,98* (18)	54,42±1,97* (20)	58,27±1,59* (41)
ДНК	21,63±1,04	22,00±0,84	20,26±0,79	22,00±0,87	20,57±0,70

* $P < 0,05 - 0,001$.

Т а б л и ц а 3

Содержание суммарного жира (в г%) и гликогена (в г%) в печени intactных крыс под воздействием пентоксила и мумие

Показатель	Контроль	Пентоксил, 100 мг/кг	Мумие, мг/кг		
			50	100	500
Жир	15,6±0,49 (36)	13,07±0,28* (22)	13,80±0,71* (7)	12,63±0,70* (8)	12,80±0,50* (39)
Гликоген	1,92±0,07 (36)	2,19±0,63** (22)	2,16±0,64** (17)	2,30±0,17** (18)	2,15±0,96** (38)

* $P < 0,01 - 0,001$.

** $P < 0,005 - 0,01$.

в марте — апреле, а затем в январе, когда животные более устойчивы (табл. 5).

Мумие в дозе 100 мг/кг вызывает отчетливое увеличение дыхательной активности на сукцинате в сахарозной среде во всех метаболических состояниях. Наибольшее увеличение потребления кислорода наблюдается при фосфорилировании добавленной АДФ. Дыхательный контроль по Ларди возрастает, а по Чансу не меняется, но соотношение скоростей дыхания отдыха и покоя (V_4/V_0) увеличивается (в контроле 1,0, в опыте 1,4). Увеличение скорости дыхания после фосфорилирования (V_4) может свидетельствовать об увеличении АТФ-азных реакций и расхода синтезирующейся АТФ ввиду усиленного под воздействием мумие биосинтеза. Процесс потребления кислорода при действии разобщителя ДНФ увеличивается не всегда достоверно.

На солевой среде инкубации наблюдаются аналогичные изменения дыхания, за исключением скорости V_3 , которая в процентном отношении увеличивается меньше. Последнее может быть связано с тем, что митохондрии под влиянием самого мумие набухают (увеличивается их проницаемость), и поэтому разница между V_3 контроля и опыта в солевой среде меньше, чем в сахарозной. Энергетический процесс в митохондриях под воздействием мумие находится в состоянии активности, а солевая среда требует дополнительного расхода энергии.

Данные опытов с дозой мумие 500 мг/кг подтверждают это предположение. Скорости дыхания покоя и отдыха (V_0 и V_4) не изменяются, а скорость дыхания при фосфорилировании даже снижается. Вероятно, функ-

Гликолиз в гомогенатах печени интактных крыс под влиянием пентоксила и мумие

Группа животных	Субстрат					
	глюкоза		глюкоген		глюкозо-6-фосфат	
	I	II	I	II	I	II
Контроль (n=14)	45,00±6,32	0,308±0,024	182,53±20,90	1,249±0,120	173,10±6,63	1,062±0,12
Введение пентоксила, 100 мг/кг (n=6)	149,00±13,34 P<0,001	1,021±0,091 P<0,001	213,65±13,15 P<0,1	1,463±0,090 P<0,1	191,60±29,005	1,313±0,19
Введение мумие: 100 мг/кг (n=7)	80,10±11,45 P<0,02	0,535±0,088 P<0,05	161,30±25,70	1,111±0,170	142,21±15,56	0,974±0,11
500 мг/кг (n=8)	91,10±12,85 P<0,01	0,727±0,089 P<0,01	154,90±28,20	1,061±0,170	205,30±31,58	1,406±0,24

Примечание. I — мкмоль лактата, II — мкмоль лактата, мг белка в час.

циональное перенапряжение митохондрий приводит к ингибированию процессов фосфорилирования. При повторении этой серии опытов в зимних условиях с использованием дозы мумие 500 мг/кг получены принципиально аналогичные результаты (увеличение дыхания во всех метаболических состояниях), но V_1 не изменялась более V_0 , а $V_{днф}$ изменялась аналогично контролю. Видимо, эти различия связаны с сезонными колебаниями метаболической активности митохондрий. На солевой среде был обнаружен еще более четкий ингибирующий эффект, очевидно, связанный с ингибированием ферментных систем цикла Кребса, поскольку дыхательный контроль в опытной и контрольной группах не различается. В этой же серии опытов было изучено действие пентоксила в дозе 200 мг/кг. Качественно процессы дыхания (доза, величина) не отличались от действия мумие в дозе 500 мг/кг.

На α -кетоглутарате при дозе мумие 100 мг/кг процесс дыхания качественно аналогичен происходящему на сукцинате. Мумие в дозе 500 мг/кг и пентоксил в дозе 200 мг/кг на сахарозной среде инкубации дают более слабое проявление ингибирующего эффекта, а на солевой среде этот эффект еще более выражен. Пентоксил увеличивает дыхательную активность в меньшей мере, чем мумие в дозе 100 мг/кг. Кроме того, он дает неблагоприятный эффект на НАД-зависимых субстратах — снижается дыхательный контроль и коэффициент $V_0/V_{днф}$.

Необходимо подчеркнуть, что, несмотря на недостоверность изменения некоторых показателей, увеличение дыхательной активности проис-

Т а б л и ц а 5

Влияние мумие на дыхание митохондрий печени интактных крыс

Субстрат	Среда	Группа	Скорость дыхания				Дыхательный контроль		
			V_0	V_s	V_4	$V_{ДНФ}$	V_s/V_0	V_s/V_4	$V_0/V_{ДНФ}$
Сукцинат	Сахарозная	1	22,95±1,32	48,00±4,24	24,65±3,62	59,52±4,25	2,18±0,015	2,05±0,14	0,412±0,012
		2	37,02±1,40	99,60±8,69	49,21±3,77	80,18±9,44	2,72±0,098	2,04±0,063	0,364±0,019
		P	<0,001	<0,001	<0,001	>0,1	<0,001	—	<0,05
		3	38,34±2,89	75,82±6,56	47,20±4,64	101,67±8,59	1,95±0,074	1,61±0,049	0,450±0,003
		P	<0,001	<0,002	<0,001	<0,001	<0,1	<0,02	<0,01
	Солевая	1	26,36±0,65	55,21±4,95	34,58±1,44	77,48±8,69	2,37±0,087	1,75±0,053	0,408±0,026
		2	44,50±1,25	96,57±2,49	61,08±0,84	94,20±2,70	2,24±0,008	1,77±0,020	0,468±0,014
		P	<0,001	<0,001	<0,001	>0,1	<0,1	—	<0,05
		3	37,00±3,98	74,09±10,34	50,30±5,12	121,50±20,59	1,98±0,106	1,68±0,21	0,347±0,022
		P	<0,02	>0,1	<0,01	<0,05	<0,01	—	>0,1
Кетоглутарат	Сахарозная	1	19,50±0,97	43,00±3,71	21,40±1,38	43,10±3,64	2,17±0,093	1,96±0,097	0,480±0,028
		2	32,29±0,35	73,27±3,18	41,28±1,09	74,61±7,18	2,26±0,04	1,75±0,026	0,519±0,037
		P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—	<0,05	<0,1
		3	25,97±0,88	38,14±2,19	21,40±1,39	41,46±1,44	1,76±0,058	1,81±0,072	0,455±0,009
		P	<0,01	<0,1	—	—	<0,001	<0,1	<0,1
	Солевая	1	20,18±3,99	47,18±3,74	28,12±1,93	56,00±7,43	2,58±0,15	1,74±0,043	0,412±0,046
		2	32,46±0,50	73,35±11,18	43,20±3,2	53,56±0,65	2,22±0,25	1,75±0,017	0,805±0,017
		P	<0,05	<0,05	<0,001	—	<0,1	—	<0,001
		3	12,05±0,10	36,86±2,96	11,92±0,35	19,40±0,12	2,31±0,04	2,82±0,25	0,493±0,071
		P	>0,1	<0,05	<0,001	<0,001	>0,1	<0,001	>0,1

Примечание. 1 — контроль ($n=11-14$); 2 — мумие, 100 мг/кг ($n=8-12$); 3 — мумие, 500 мг/кг ($n=8-16$ животных); результаты выражены в наторм O_2 /мин на 1 мг белка.

ходит во всех метаболических состояниях, в 2 средах инкубации и на 2 различных субстратах и, следовательно, является общей закономерностью.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили влияние пентоксила на нуклеиновый и белковый обмен и позволили установить, что саянское мумие оказывает аналогичное анаболическое действие. Энергетическое обеспечение этого эффекта происходит за счет увеличения гликолиза и, главное, за счет усиления процессов дыхания и фосфорилирования, преобладания липолиза над липогенезом.

Кроме того, распространенное мнение о полной безвредности НБС, по-видимому, не обосновано. При повышении дозы НБС непосредственные эффекты активации обменных процессов еще сохраняются (в большинстве опытов при дозе мумие 500 мг/кг уже отмечается некоторое снижение показателей), но процессы клеточного дыхания начинают нарушаться. При еще больших дозах нарушения обмена, по-видимому, будут возрастать.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стручков В. Н. и др. Антибиотики в хирургии. М., 1973, с. 33—34.
2. Материалы конференции по проблеме медицинского применения пиримидиновых производных. Ростов, 1961.
3. Материалы конференции по применению пиримидиновых и пуриновых производных в онкологии и других областях медицины. Л., 1963.
4. Материалы конференции по проблеме применения пиримидиновых и пуриновых производных в онкологии и других областях медицины. Л., 1966.
5. Материалы конференции по применению пиримидиновых и пуриновых производных в гастроэнтерологии. Барнаул, 1967.
6. Материалы конференции по применению пиримидиновых и пуриновых производных при заболеваниях органов дыхания. Горький, 1969.
7. Лифшиц Р. И. Пиримидиновые производные, как факторы белкового анаболизма. Дис. докт. Челябинск, 1965.
8. Русаков В. И. Регуляция воспаления и регенерации в хирургии. Ташкент, 1971.
9. Билич Л. Г. Стимуляция регенерации и защитных механизмов в детской хирургии. М., 1976.
10. Ермольева З. В., Вайсберг Г. Е. Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды. М., 1976.
11. Материалы 1-го Межреспубликанского симпозиума по экспериментальному изучению мумис. Душанбе, 1965.
12. Таджиев К. Т. и др. Мумие и стимуляция регенераторных процессов. Душанбе, 1971.
13. Мумис и его лечебное применение (Тезисы симпозиума). Пятигорск, 1972.
14. Нуралиев Ю. Н. Фармакология мумис. Дис. докт. Ярославль, 1973.
15. Паук С. И., Тухтаев Т. М. — В кн.: Материалы 1-й научной конференции молодых ученых. Душанбе, 1971, с. 37—38.
16. Шакиров А. Ш. Мумис-асиль в комплексном лечении переломов костей. Ташкент, 1976.
17. Сыровежко Н. В. и др. — В кн.: Материалы научно-практической конференции по проблеме «Основы развития фармации и изыскание новых способов изготовления лекарств». Тюмень, 1970, с. 256.
18. Мансурова И. Д. Биохимия печени при болезни Боткина и боткинских циррозах. М., 1964.
19. Абдуллаев Н. Х. — «Вопр. мед. химии», 1966, № 6, с. 627—632.
20. Он же. — «Пробл. эндокринол.», 1966, № 4, с. 106—110.
21. Цанев Р. Г., Марков Г. Г. — «Биохимия», 1960, № 1, с. 151—157.
22. Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965, с. 332.
23. Кондрашова М. Н. и др. — В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., 1973, с. 106 и 50.
24. Дэдли С., Никольсон Д. Метаболические пути. М., 1973, с. 61.

Поступила 14/1 1977 г.

ON THE EFFECT OF UNSPECIFIC BIOGENIC STIMULANTS PENTOXYL AND MUMMIE ON SOME METABOLIC PROCESSES

A. G. Shvetsky, L. M. Vorob'eva

Chair of General Surgery, Central Research Laboratory, Medical School, Krasnoyarsk.

Unspecific biogenic stimulants (pentoxyl and mummie) accelerated metabolism of nucleic acids and protein in rat liver tissue. After the treatment with the stimulants the rate of lipolysis exceeded that of lipogenesis. Increase in content of lactate was similar if glycogen and glucose-6-phosphate were used as substrates of glycolysis, but it was stimulated 2-3-fold, when glucose was used; the phenomenon appears to be due to activation of hexokinase. As shown by polarographic measurements mitochondrial respiration was increased in all the metabolic states, but increased doses caused an inhibition of phosphorylation apparently due to functional overstrain of mitochondria. Increased doses of the stimulants accelerated also some other metabolic processes studied, but the effects were not dose-dependent. Pentoxyl and mummie apparently increased processes of protein and nuclei acid metabolism and stimulated the energy-providing reactions.

А. В. Попов, А. Г. Виноградов, В. В. Надточий

ЭЛЕКТРОННО-АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОЕ И БИОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ПЕНИСТЫХ КЛЕТОК В МЕТАБОЛИЗМЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Отдел атеросклероза им. акад. Н. Н. Аничкова и лаборатория цитологии Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград (Работа частично поддержана грантом ВОЗ)

Участие пенистых клеток в метаболизме липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) изучено с помощью биохимических методов и метода электронной автордиографии. Пенистые клетки выделяли из атеросклеротических кроличьих аорт после их перфузии in vitro в течение 6 ч мечеными 125 ЛПНП. О характере метаболической активности пенистых клеток судили по соотношению радиоактивности в белковой и липидной составляющих клеток, а также по распределению гранул восстановленного серебра над субклеточными структурами на автордиографах. Биохимические данные позволяют сделать заключение о преимущественном накоплении в пенистых клетках липидных компонентов ЛПНП.

Электронно-автордиографическое исследование свидетельствует о том, что белок липопротеидной частицы также выявляется внутриклеточно в различных цитоплазматических структурах. Предполагается, что пенистые клетки скорее всего захватывают интактные липопротеидные частицы путем пиноцитоза с последующим расщеплением белкового компонента лизосомным аппаратом клетки.

Пенистые клетки являются одним из важнейших структурных образований, определяющих специфику атеросклеротического процесса, особенно на его ранних стадиях. Однако функциональная значимость этих клеточных элементов в генезе атеросклероза во многом остается неясной. В настоящее время наиболее общепризнанной точкой зрения считается, что образование и последующее накопление пенистых клеток в очаге атеросклеротического поражения связано с трансформацией гладкомышечных клеток в результате поглощения ими липидов плазменного происхождения [1—4]. Это рассматривается как ответная реакция гладкомышечных клеток на появление и накопление липидов внутри артериальной стенки. Поскольку липиды плазмы крови проникают в артериальную стенку главным образом в составе липопротеидов [5—8], то выяснение роли пенистых клеток в атерогенезе неразрывно связано с пониманием механизмов их участия в метаболизме атерогенных липопротеидов. В исследованиях по изучению способности гладкомышечных клеток культуры ткани поглощать липопротеиды различных классов было показано проникновение белковых и липидных компонентов липопротеидной частицы в клетки, причем более выраженное накопление липидов в этих клетках различные авторы объясняют по-разному. Ряд авторов [8—10] полагают, что преимущественное накопление липидов в клетке вряд ли можно объяснить быстрым внутриклеточным метаболизмом белковой части липопротеидов. Другие авторы [11, 12], а в последнее время и упомянутые выше [13, 14] высказывают точку зрения, подкрепляемую экспериментально [14], что распад липопротеидной частицы происходит внутри клетки при участии лизосомного аппарата, протеолитическая активность которого выше активности липолитических энзимов. При изучении взаимодействия печеночных паренхиматозных клеток с мечеными 125 липопротеидами было показано, что протеолиз белкового компонента липопротеидов протекает исключительно в лизосомах клетки [15]. Имеется ряд экспериментальных исследований [16], свидетельствующих о том, что в процессе развития атеросклероза в гладких мышечных клетках артерий увеличиваются как количество лизосом, так и их активность. Отмечается также снижение плотности лизосом вследствие накопления в них холестерина и его эфиров. Особое внимание обращается на способность гладкомышечных клеток сорбировать значительное количество липопротеидов на своей поверхности, преимущественно липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), что,

по мнению авторов [17], связано с наличием специфических рецепторов на поверхности гладкомышечных клеток к липопротеидам, содержащим апо-липопротеин-В. Ввиду этого особенно важным является сопоставление результатов биохимического и автордиографического исследований, позволяющих наряду с установлением общих количественных закономерностей выявить особенности распределения липопротеидной метки среди различных субклеточных структур.

Мы провели биохимическое и электронно-автордиографическое исследование, посвященные выяснению механизмов участия пенистых клеток в метаболизме ЛПНП.

Методы

В качестве доноров аорт использовали кроликов массой 2,5—3 кг с экспериментальным атеросклерозом. Атеросклероз вызывали скормливанием животным ежедневно с овощами холестерина из расчета 1 г на 1 кг массы тела в течение 4—6 мес.

Изолированные атеросклеротические аорты перфузировали мечеными ^{125}I ЛПНП в течение 6 ч при 37°C по ранее описанному методу [18]. Перфузионной средой служил 5% раствор бычьего альбумина на среде Игла с добавлением меченых ЛПНП. ЛПНП выделяли ультрацентрифугированием [19] и йодировали ^{125}I [20]. После окончания перфузии внутреннюю поверхность аорты тщательно отмывали смесью нормальной кроличьей сыворотки с физиологическим раствором (1 : 1). Интиму с прилегающими участками меди отделяли от адвентиции и выделяли пенистые клетки по ранее описанному методу [21] с использованием коллагеназы и эластазы («Sigma»). О жизнеспособности липидных макрофагов судили по общепринятому методу окраски клеток 0,2% раствором трипанового синего. Выделенные клетки считали в камере Горяева.

Липиды экстрагировали из клеток хлороформ-метаноловой смесью (1 : 1) после обработки их 10% раствором трихлоруксусной кислоты. Радиоактивность подсчитывали на сцинтилляционном счетчике Nuclear Chicago, III Unilux в гамма-виалах.

Для электронно-микроскопического исследования аликвоту суспензии липидных макрофагов и кусочки аорты фиксировали в 5% глутаральдегиде («Fluka») на 0,1 М каодиатном буфере («Sigma») pH 7,4, промывали в 0,44 М сахарозе, обрабатывали 1% раствором четырехокси осмия на ацетат-вероналовом буфере pH 7,2 при 0°C в течение 2 ч. Материал проводили через ряд спиртов восходящей крепости и заливали в эпон-812. Ультратонкие срезы готовили с помощью стеклянных ножей на микротоме LKB. На ультратонкие срезы, помещенные на сетки, наносили методом петли ядерную эмульсию ПР-2 (размер зерна 0,1 мкм) и экспонировали в течение 3 мес в светонепроницаемом контейнере на силикагеле при -4°C. Автографы проявляли по общепринятой методике [22].

Результаты

Пенистые клетки, выделенные из атеросклеротической аорты кролика после перфузии ее мечеными ^{125}I ЛПНП ($1\text{—}3 \cdot 10^6$ клеток из одной аорты), по данным световой и электронной микроскопии, сохраняли свою жизнеспособность и нативную структуру. Клетки размером 15—60 мкм в диаметре круглой или овальной формы содержали одно ядро различной плотности, обычно расположенное асимметрично. Количество и размеры липидных вакуолей в различных клетках варьировали в широком диапазоне. В большинстве клеток были видны миелоноподобные структуры, в некоторых — кристаллы холестерина. Полиморфизм клеток (рис. 1 и 2, см. вклейку), по-видимому, обусловлен различными стадиями трансформации и зрелости пенистых клеток. На клеточной поверхности обычно хорошо были видны микроворсинки, что также свидетельствовало о сохранении нативности выделенных липидных макрофагов.

Анализ радиоавтографов показал, что основная часть гранул восстановленного серебра расположена над цитоплазматическими структурами пенистых клеток, главным образом над липидными вакуолями. Часть метки была связана с лизосомами (рис. 3, см. вклейку). Незначительное количество метки выявлялось в области наружной поверхности плазматической мембраны. При ультраструктурном автордиографическом исследовании срезов кусочков аорт только небольшая часть метки выявлялась в клетках, тогда как основная ее часть находилась во внеклеточном пространстве.

Биохимический анализ липопротеидов перфузата показал, что в среднем только $6,3 \pm 0,97\%$ радиоактивности было связано с липидами, в то

время как основная радиоактивность ($93,60 \pm 2,10\%$) находилась в белковой части липопротеидов. При расчете на абсолютное содержание липида и белка в липопротеидах перфузата были получены данные об удельной радиоактивности липидной и белковой частей липопротеидов, составляющих соответственно в среднем $6,7 \cdot 10^4$ и $5,6 \cdot 10^6$ имп/мг/мин.

Распределение липидной и белковой частей ЛПНП в пенистых клетках атеросклеротической аорты кролика

№ опыта	Удельная радиоактивность белка и липида липопротеида перфузата, имп/мин/мг		Радиоактивность клеток, выделенных из одной аорты, имп/мин		Проникновение компонентов липопротеидов в клетки, выделенные из одной аорты, мкг		Соотношение липид/белок в клетке, %	
	белок	липид	белок	липид	белок	липид	белок	липид
1	$8,2 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^4$	132	178	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$320 \cdot 10^{-2}$	0,5	99,5
2	$8,2 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^4$	106	154	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$270 \cdot 10^{-2}$	0,4	99,6
3	$5,2 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^4$	236	64	$4,5 \cdot 10^{-2}$	$170 \cdot 10^{-2}$	2,7	97,3
4	$5,2 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^4$	400	131	$7,6 \cdot 10^{-2}$	$340 \cdot 10^{-2}$	2,2	97,8
5	$3,5 \cdot 10^6$	$10,8 \cdot 10^4$	0	30	0	$26 \cdot 10^{-2}$	0	100
6	$3,5 \cdot 10^6$	$10,8 \cdot 10^4$	0	72	0	$66 \cdot 10^{-2}$	0	100

Определение радиоактивности липида и белка в пенистых клетках показало, что радиоактивность липидной части составляла в среднем $60,1\%$ от общей внутриклеточной радиоактивности, а белковой — в среднем $38,3\%$. Учитывая низкую удельную радиоактивность липидов в исходных липопротеидах перфузата по сравнению с удельной радиоактивностью белка можно сделать вывод о преимущественном накоплении липидов липопротеидной частицы внутри клеток по сравнению с белком. С большей наглядностью представление об этом процессе может дать расчет абсолютных количеств поступившего липида и белка в клетки, сделанный на основании их удельной радиоактивности в исходных липопротеидах перфузата. Эти данные позволяют с определенной долей приближения считать, что в результате взаимодействия пенистых клеток с ЛПНП поглощенный клетками материал состоял в среднем на $99,0 \pm 0,47\%$ из липида и на $0,97 \pm 0,47\%$ из белка (см. таблицу).

Обсуждение

Проведенное исследование позволило установить некоторые особенности участия пенистых клеток в метаболизме атерогенных липопротеидов. Данные, полученные с помощью биохимических методов, свидетельствуют о преимущественном накоплении в клетке липидной составляющей липопротеидов. Радиоактивность белка, связанная с пенистыми клетками, в биохимических исследованиях обычно во всех опытах была довольно низкой. Это могло быть следствием либо распада липопротеидной частицы на поверхности клетки и последующего проникновения в нее только липидных компонентов, либо, как уже отмечалось ранее, результатом более быстрого распада белкового компонента внутри самой клетки после захвата ею интактной липопротеидной частицы.

В пользу первого предположения можно было бы привести данные [9], показавшие, что при инкубации с гладкомышечными клетками культуры ткани ЛПНП человека и липопротеидов высокой плотности крысы образование продуктов гидролиза белка за 24 ч составляло соответственно 1,5 и 3,0% от общей радиоактивности поглощенного клетками белка липопротеида. Эти данные позволяют думать, что преобладание липидного компонента липопротеида внутри клеток является не только результатом более быстрого внутриклеточного расщепления белка липопротеида.

Рассмотрим более подробно аргументы в пользу второй точки зрения. Прежде всего следует отметить данные [23, 24] о способности фибробластов и гладкомышечных клеток культуры ткани расщеплять до аминокислот белок ЛПНП инкубационной среды. Авторадиографическое выявление метки внутри пенистых клеток в наших опытах свидетельствует в пользу проникновения определенной части белка ЛПНП внутрь клетки, так как липиды из клеток эстрагировались (удалялись) в процессе подготовки препаратов для электронной микроскопии [9]. Далее при инкубации выделенных из атеросклеротической аорты кролика пенистых клеток с мечеными липопротеидами [25] отношение липид/белок в клетках мало изменялось по сравнению с липопротеидами инкубационной среды, что, несомненно, свидетельствовало о проникновении внутрь клеток более значительных количеств белка, чем в настоящих опытах с перфузией изолированной аорты мечеными липопротеидами и последующим выделением из нее пенистых клеток. В связи с этим уместно напомнить данные [26] о том, что после внутривенного введения крысам таких белков, как гемоглобин и пероксидаза хрена, гладкомышечные клетки аорты захватывали эти белки путем пиноцитоза и расщепляли их в лизосомном аппарате клетки. При инкубации гладкомышечных клеток аорты быка с пероксидазой происходило то же самое. Диаметр пиноцитозных везикул составлял 650—1000 Å. Авторы подчеркивают, что размер этих везикул дает основание считать, что все классы липопротеидов, за исключением хиломикронов, могут проникать внутрь гладкомышечных клеток путем пиноцитоза. Частицы размером более 3000 Å (латекс) захватывались клетками путем фагоцитоза.

Не предпреляя окончательно вопрос о механизме накопления липидов в пенистых клетках, отметим, что пиноцитозная и фагоцитарная активность присуща пенистым клеткам не в меньшей степени, чем гладкомышечным (недаром пенистые клетки называют еще и липидными макрофагами). В связи с этим нельзя исключить возможность пиноцитоза целых липопротеидных частиц в пенистых клетках. Этот вопрос, однако, требует дальнейших исследований.

Учитывая, что пенистые клетки образуются из гладкомышечных и по многим своим свойствам напоминают последние, мы сочли возможным на протяжении всей статьи проводить определенный параллелизм и сравнение взаимодействия тех и других клеток с липопротеидами. Вместе с тем мы отдаем себе отчет в том, что протеолитическая активность лизосом пенистых клеток атеросклеротической аорты может быть значительно выше аналогичной активности культивируемых гладкомышечных клеток, не говоря уже о фибробластах. Основной вывод работы заключается в том, что при взаимодействии пенистых клеток с липопротеидами, изучение которого до сих пор еще не проводилось, наблюдается внутриклеточное накопление липидов, а электронно-авторадиографически — небольшие количества белка липопротеидного происхождения в цитоплазматических структурах пенистых клеток (преимущественно в области липидных вакуолей и частично в лизосомах).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ghidoni J. J., O'Neal R. M. — «Exp. molec. Path.», 1967, v. 7, p. 378—400.
2. Nadkarni B., Heggtveit H. A., Nadkarni R. — «Indian J. med. Res.», 1970, v. 158, p. 428—436.
3. Ross R., Glomset I. A. — «Science», 1973, v. 180, p. 1332—1339.
4. Goldfischer S., Schiller B., Wolinski H. — «Am. J. Path.», 1975, v. 78, p. 497—502.
5. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Попов А. В. и др. — In: Schettler F., Weizl A. (Eds) *Atherosclerosis. Proceedings of the 3d International Symposium*. New York, 1974, p. 85—88.
6. Попов А. В., Кетлинский С. А., Тарарак Э. М. — «Arterial Wall», 1975, v. 3, p. 61—69.
7. Климов А. Н., Попов А. В. — «Кардиология», 1976, № 2, с. 30—37.
8. Bierman E. L., Eisenberg S., Stein O. et al. — «Biochim. biophys. Acta», 1973, v. 329, p. 163—169.
9. Bierman E. L., Stein O., Stein Y. — «Circulat. Res.», 1974, v. 35, p. 136—150.
10. Stein O., Stein Y. — «Biochim. biophys. Acta», 1975, v. 398, p. 377—384.
11. De Du-

ve C. — «Circulation», 1975, v. 52, Suppl. 2, abstr. 3. — 12. Jackson R. L., Gotto A. M. — «Atheroscler. Rev.», 1976, v. 1, p. 1—21. — 13. Stein Y., Stein O. — «Triangle», 1976, v. 15, p. 63—69. — 14. Bierman E. L., Albers J. J. — «Biochim. biophys. Acta», 1975, v. 388, p. 198—202. — 15. Nakai T., Whayne T. — In: 4th International Symposium on Atherosclerosis. Abstracts. Tokyo, 1976, v. 206. — 16. Clair R. W. — «Atheroscler. Rev.», 1976, v. 1, p. 61—117. — 17. Bierman E. L., Albers J. J. — «Advanc. exp. Med. Biol.», 1976, v. 67, p. 437—452. — 18. Попов А. В., Герчикова Е. А. — «Пат. физиол.», 1974, № 3, с. 79—81. — 19. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. — «J. clin. Invest.», 1975, v. 34, p. 1345—1353. — 20. Helmkamp R. W., Contreras M. A., Izzo J. — «Int. J. appl. Radiat.», 1967, v. 18, p. 747—757. — 21. Виноградов А. Г., Алкснис Е. Г., Попов А. В. и др. — «Кардиология», 1976, № 2, с. 37—41. — 22. Salpeter M. M., Bachmann L. — «J. Cell. Biol.», 1964, v. 22, p. 469—477. — 23. Goldstein J. L., Brown M. S. — «Arch. Path.», 1975, v. 99, p. 181—184. — 24. Goldstein J. L., Brunstein G. J., Brown M. S. — «J. biol. Chem.», 1975, v. 250, p. 7854—7862. — 25. Vinogradov A. G., Попов А. В., Алкснис Е. Г. et al. — In: 2. Dresden Lipidsymposium. Abstracts. Dresden, 1976, p. 67—69. — 26. Coltoff-Sciller B., Goldfischer S., Wolinsky H. — «Circulation», 1975, v. 52, Suppl. 2, abstr. 407.

Поступила 10/III 1977 г.

FUNCTION OF FOAM CELLS IN METABOLISM OF LOW DENSITY LIPOPROTEINS

A. V. Popov, A. G. Vinogradov, V. V. Nadtochy

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Participation of foam cells in metabolism of lipoproteins of low density (LPLD) was studied by biochemical methods and by electronic autoradiography. The foam cells were isolated from atherosclerotic rabbit aorta after perfusion with 125 I-LPLD within 6 hrs. Metabolic activity of foam cells was evaluated by the ratio of radioactivity in lipid and protein components of cells as well as by distribution of reduced argentine granules among the subcellular structures on autoradiogram. The biochemical studies showed that the lipid components of LPLD were preferably accumulated in foam cells. Electronic-autoradiography demonstrated that protein from the lipoprotein particles was also distributed intracellularly in various cytoplasmic structures. Foam cells appear to capture intact lipoprotein particles by pinocytosis with subsequent splitting of protein component by cellular lysosome apparatus.

УДК 612.017.1-06:612.015.11

В. А. Кобляков, А. Ю. Коляда

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ МИКРОСОМАЛЬНЫХ ОКСИГЕНАЗ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ 2-АЦЕТИЛАМИНОФЛУОРЕНА

Онкологический научный центр АМН СССР, Москва

Исследовано изменение содержания компонентов ферментной системы микросомальных оксигеназ при скормливаниях крысам 2-ацетиламинофлуорена (ААФ). Показано, что содержание цитохрома Р-450 снижается начиная с 4-й недели эксперимента. Активность НАДФ-Н-цитохром с-редуктазы выше у животных, получавших ААФ, чем у контрольных. Способность к индукции этой ферментной системы индукторами первого и второго рода сохраняется до конца эксперимента, т. е. вплоть до появления опухолей печени.

Ферментная система микросомальных оксигеназ (ФСМО), локализованная в эндоплазматическом ретикулуле клетки, катализирует реакции окисления как чужеродных веществ, превращая их в более водорастворимые, с последующим выведением из организма, так и эндогенных соединений, как, например, стероидов [1]. В отличие от большинства известных ферментов и ферментных систем организма, нацеленных на один строго определенный субстрат, ФСМО способна катализировать превращения большого круга веществ разнообразного химического строения. Эта неспецифичность по отношению к субстрату делает ФСМО ключевым элементом защиты организма от токсического воздействия чужеродных веществ.

В настоящей работе изучалась способность ФСМО^У к индукции при хроническом введении 2-ацетиламинофлуорена (ААФ). Это соединение обладает токсическим и гепатоканцерогенным действием [2].

Методика

В опыте использовали белых беспородных крыс-самцов весом 180 г. Животных содержали на синтетической диете с пониженным содержанием рибофлавина (12% белка, 8% масла, 1 мг/кг рибофлавина). Опытной группе животных в дисту добавляли 0,06% ААФ (Austrowaren). На 4-й и 9-й неделях эксперимента животные опытной группы получали диету без канцерогена. В качестве индуктора первого рода использовали фенобарбитал (ФБ), вводившийся внутривентриально в физиологическом растворе из расчета 75 мг/кг веса тела животного, на протяжении 4 дней перед забоем. В качестве индуктора второго рода использовали 20-метилхолантрен (МХ), вводившийся внутривентриально в масле в течение 2 дней перед забоем из расчета 20 мг/кг веса тела. После декапитации животных печень перфузировали охлажденным 1,15% раствором КС1. Перфузированную печень гомогенизировали в этом растворе и центрифугировали при 15 000 g в течение 15 мин. Из надосадочной жидкости путем центрифугирования при 80 000 g в течение 90 мин осаждали микросомальную фракцию. Осадок ресуспендировали в 1,15% КС1. Содержание цитохромов Р-450 и b_5 определяли спектрофотометрически по методу [3]. Значения коэффициентов молярной экстинкции принимали для цитохрома b_5 185 $\text{мМ}^{-1} \text{см}^{-1}$, а для цитохрома Р-450 — 91 $\text{мМ}^{-1} \text{см}^{-1}$. В качестве регистрирующего прибора использовали дифференциальный спектрофотометр ДСФ-1М. Активность НАДФ·Н- и НАД·Н-цитохром с-редуктаз определяли по методу [4] при температуре 30° на спектрофотометре Unicam SP-800. Белок определяли при помощи биуретовой реакции [5].

Статистическую обработку результатов производили по критерию Вилкоксона — Манна — Уитни [6]. Каждая точка в приведенных результатах представляет собой среднюю данного параметра, измеренного у 3 животных. Переход цитохрома Р-450 в Р-448 определяли на спектрофотометре Unicam SP-800 [7].

Результаты

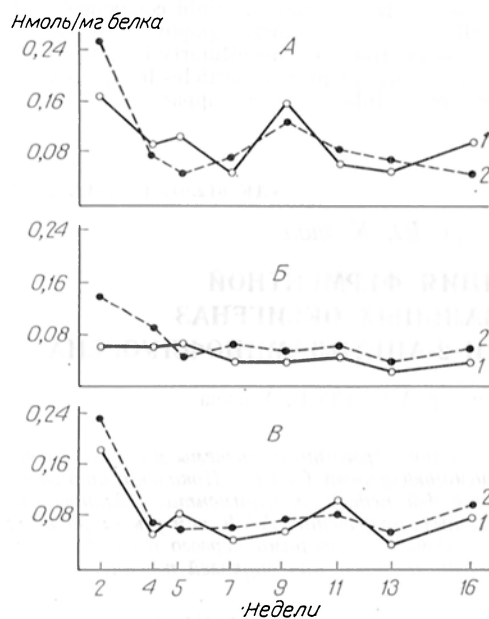


Рис. 1. Изменение количества цитохрома b_5 в микросомальной фракции печени крыс, получавших контрольную диету (1) и диету — ААФ (2).

А — без применения индуктора; Б — с применением в качестве индуктора ФБ; В — с применением в качестве индуктора МХ. На каждую точку приходится 3 животных.

Для усиления гепатоканцерогенного действия ААФ крыс содержали на синтетической диете [8]. Недостаточность рибофлавина в этой диете приводит к уменьшению содержания цитохромов Р-450 и b_5 (рис. 1 и 2), что согласуется с данными литературы [9]. К 4-й неделе кормления количество цитохромов стабилизируется и не изменяется в дальнейшем на протяжении всего эксперимента. У крыс, получавших вместе с диетой ААФ, содержание цитохрома Р-450 ниже, чем у контрольных животных, начиная с 4-й недели вплоть до 16-й недели, когда у опытных животных обнаруживаются опухоли печени; $P < 0,01$ (рис. 2, А).

Содержание цитохрома b_5 в процессе канцерогенеза изменяется довольно значительно. Минимальное количество цитохрома отмечается на 7-й и 16-й неделях эксперимента, максимальное — на 11-й неделе. Достоверных различий в содержании этого цитохрома между контролем и опытом в процессе эксперимента не наблюдается; $P > 0,05$ (рис. 1, А).

Параллельно с количеством цитохромов Р-450 и b_5 определяли НАДФ·Н-цитохром с-редуктазную и НАД·Н-цитохром с-редуктазную актив-

ность. НАД·Н-цитохром с-редуктазная активность у животных, получавших канцероген, не отличается от таковой у контрольных животных; активность НАДФ·Н-цитохром с-редуктазы у животных, получавших канце-

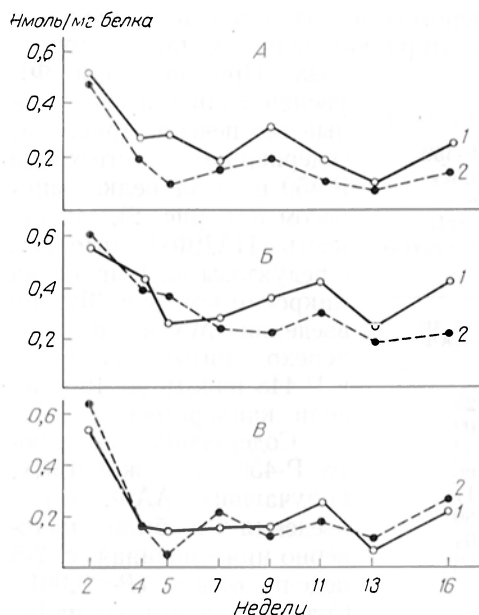


Рис. 2. Изменение количества цитохрома Р-450 в микросомальной фракции печени крыс.

Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

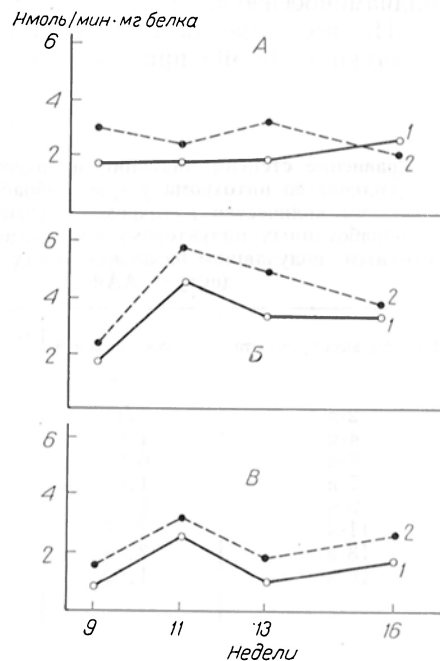


Рис. 3. Изменение активности НАДФ·Н-цитохром с-редуктазы в печени крыс.

Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

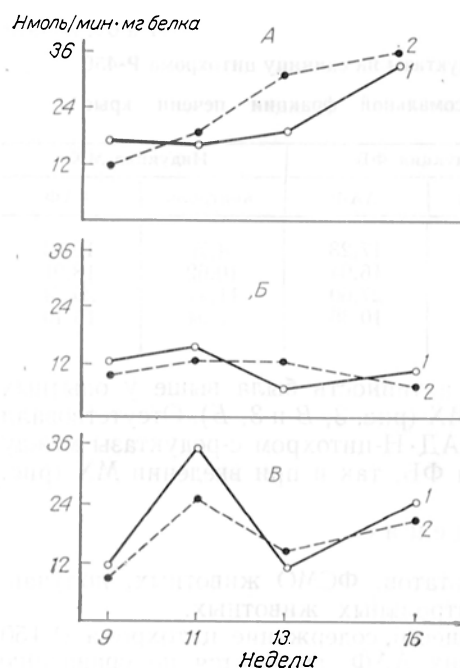


Рис. 4. Изменение активности НАД·Н-цитохром с-редуктазы в печени крыс.

Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

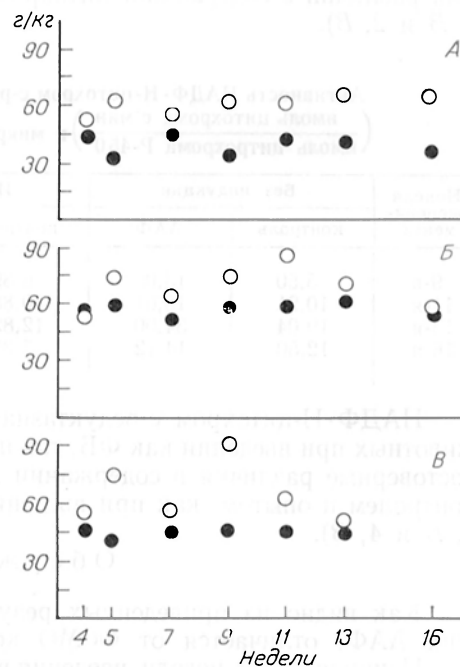


Рис. 5. Изменение относительного веса печени крыс (вес печени/вес тела животного, в г/кг).

Черные кружки — контрольная диета; белые кружки — контрольная диета+ААФ. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

роген, достоверно выше, чем у контрольных животных; $P < 0,01$ (рис. 3, А и 4, А). Повышение активности этого фермента в процессе гепатоканцерогенеза показана в случае применения в качестве канцерогена 3'-метилдиаминобензола [10].

На всем протяжении гепатоканцерогенеза сохранялась способность к индукции ФСМО при введении индуктора как первого, так и второго

рода. При введении ФБ увеличивались относительный вес печени (рис. 5), содержание цитохрома Р-450 на 1 мг белка микросом (см. рис. 2), активность НАДФ·Н-цитохром с-редуктазы на 1 мг белка микросом (см. рис. 3); при введении МХ наблюдался переход цитохрома Р-450 в Р-448 вплоть до 16-й недели канцерогенеза.

Содержание цитохрома Р-450 у животных, получавших ААФ, после введения ФБ было достоверно ниже начиная с 7-й недели опыта ($P < 0,001$). Содержание цитохрома b_5 , наоборот, при введении

ФБ увеличивалось у опытных животных по сравнению с таковым у контрольных; $P < 0,05$ (рис. 1, Б и 2, Б). Введение МХ не вызывало достоверных различий в содержании цитохромов между контролем и опытом (рис. 1, В и 2, В).

Т а б л и ц а 1

Сравнение степени индукции цитохрома Р-450 (количество цитохрома у крыс, обработанных ФБ/количество цитохрома у крыс, не обработанных индуктором) при введении ФБ животным, получавшим базальную диету и базальную диету + ААФ

Неделя эксперимента	Базальная диета	Базальная диета + ААФ
2-я	1,11	1,25
4-я	1,65	2,09
5-я	0,95	3,42
7-я	1,65	1,60
9-я	1,13	1,11
11-я	2,34	2,80
13-я	3,08	2,04
16-я	1,69	1,53

Т а б л и ц а 2

Активность НАДФ·Н-цитохром с-редуктазы на единицу цитохрома Р-450
 $\left(\frac{\text{нмоль цитохрома с/мин}}{\text{нмоль цитохрома Р-450}} \right)$ в микросомальной фракции печени крыс

Неделя эксперимента	Без индукции		Индукция ФБ		Индукция МХ	
	контроль	ААФ	контроль	ААФ	контроль	ААФ
9-я	5,50	13,06	6,39	17,23	4,70	10,04
11-я	10,21	18,61	10,88	16,94	10,62	18,91
13-я	19,04	34,00	12,82	27,60	11,41	26,74
16-я	12,50	14,12	7,39	10,35	7,94	16,40

НАДФ·Н-цитохром с-редуктазная активность была выше у опытных животных при введении как ФБ, так и МХ (рис. 3, В и 3, Б). Отсутствовали достоверные различия в содержании НАД·Н-цитохром с-редуктазы между контролем и опытом как при введении ФБ, так и при введении МХ (рис. 4, Б и 4, В).

Обсуждение

Как видно из приведенных результатов, ФСМО животных, получавших ААФ, отличается от ФСМО контрольных животных.

Начиная с 4-й недели введения веществ, содержание цитохрома Р-450 в микросомах печени крыс, получавших ААФ, снижается по сравнению с контролем. Начиная с 7-й недели, количество цитохрома Р-450 после введения ФБ у опытных животных меньше, чем у контрольных, хотя индукбельность цитохрома Р-450 у опытных животных сохраняется (табл. 1).

НАДФ·Н-цитохром с-редуктазная активность у животных, получавших ААФ, выше, чем у контрольных, как без индукции, так и при применении индукторов обоих типов.

ФБ уменьшает содержание цитохрома b_5 , как в опыте, так и в контроле, причем в опыте в меньшей степени, чем в контроле.

Так как НАДФ·Н-цитохром с-редуктаза функционально связана с цитохромом Р-450, активность НАДФ·Н-цитохром с-редуктазы, отнесенная к единице цитохрома Р-450, может служить одной из характеристик данной ферментной системы. Как видно из табл. 2, в процессе канцерогенеза, вызванного ААФ, это соотношение намного выше в опыте, чем в контроле.

Наиболее интересным, на наш взгляд, результатом данной работы является демонстрация факта уменьшения количества цитохрома Р-450 при введении ААФ.

Известно, что в опухолевых клетках ФСМО (в частности, цитохром Р-450) или не обнаруживается [11], или ее активность сильно подавлена [12]. Именно этим фактом многие авторы объясняют меньшую чувствительность опухолевых клеток к токсическому действию канцерогенов и других веществ, которые для проявления своего действия нуждаются в предварительной ферментной активации [13]. По мнению ряда авторов [14], в процессе канцерогенеза нормальная клетка проходит ряд последовательных стадий до превращения в опухолевую клетку.

Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что уже на самых ранних стадиях гепатоканцерогенеза, когда этот процесс можно затормозить [15], в органе-мишени образуются клетки, в которых содержание цитохрома Р-450 или понижено, или этот цитохром отсутствует. В качестве альтернативы можно высказать предположение, что наблюдаемое понижение содержания цитохрома Р-450 связано не непосредственно с канцерогенным действием ААФ, а с его токсическим действием. Известно, что некоторые гепатотоксины, такие как CCl_4 , уменьшают содержание цитохрома Р-450 в печени [16].

Как видно из рис. 6, вес животных, получавших ААФ, сильно отстает от веса контрольных животных, что свидетельствует о токсическом действии ААФ. Наблюдаемый токсический эффект не является, по-видимому, необходимым для гепатоканцерогенного действия, так как известны гепатоканцерогены, например диэтилнитрозоамин, не обладающие свойством оказывать столь яркое токсическое действие.

Необходимо отметить, что способность к индукции цитохрома Р-450 сохраняется на всем протяжении опыта вплоть до появления опухолевых узлов. В печени животного с гепатомой происходит переход под действием МХ₁ цитохрома Р-450 в Р-448.

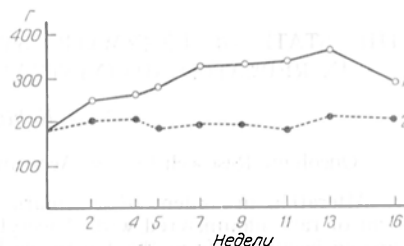


Рис. 6. Изменение веса крыс, получавших контрольную диету (1) и диету + ААФ (2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975.
2. Wilson R. H., De Eds F., Cox A. J. — «Cancer Res.», 1941, v. 1, p. 595.
3. Omura T., Sato R. — Ibid., 1964, v. 23, p. 2370.
4. Williams C. H., Kammin H. — «J. biol. Chem.», 1962, v. 237, p. 587.
5. Cornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. — Ibid., 1949, v. 177, p. 751.
6. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., 1973.
7. Aivares A. P., Schilling G., Levin W. et al. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1967, v. 29, p. 521.
8. Engel R. W., Corpeand D. H. — «Cancer Res.», 1952, v. 12, p. 211.
9. Patel J. M., Pawar S. S. — «Biochem. Pharmacol.», 1973, v. 23, p. 1467.
10. Yag

mane Y., Sakai K. — «Chem. pharm. Bull.», 1975, v. 23, p. 1440. — 11. Otagui Y., Sato N., Hagihara B. — «Cancer Res.», 1974, v. 34, p. 458. — 12. Miyake Y., Gayior J. L., Morris H. P. — «J. biol. Chem.», 1974, v. 249, p. 1980. — 13. Андрианов Л. А., Белицкий Г. А., Иванова О. Ю. и др. — В кн.: Актуальные вопросы современной онкологии. Вып. 2. М., 1970, с. 100. — 14. Sheer E., Emmelot P. — «Europ. J. Cancer», 1975, v. 11, p. 689. — 15. Meecham R. J., McCafferty D. E., Jones R. S. — «Cancer Res.», 1953, v. 13, p. 802. — 16. Арчаков А. И., Карузина И. И. — В кн.: Успехи гепатологии. Т. 7. Рига, 1973, с. 39.

Поступила 10/III 1977 г.

THE STATE OF ENZYMATIC SYSTEM OF MICROSOMAL OXYGENASES IN REPEATED ADMINISTRATION OF 2-ACETYL AMINOFLUORENE

V. A. Koblyakov, A. Yu. Kolyada

Oncologic Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Alteration in content of enzymatic components was studied in microsomal oxygenases system of rats administered with 2-acetyl aminofluorene. Content of cytochrome R-450 was decreased beginning from the fourth week of the experiment. Activity of NADP cytochrome c reductase was higher in animals, treated with the drug as compared with controls. Inductors of the I and II type were capable to induce the enzymatic system up to the end of the experiment — within 16 weeks as far as liver tumors developed.

УДК 612.123+612.1241-053.31

А. А. Никифорова, А. М. Чистякова, И. И. Матвеев, Н. П. Терюкова,
М. Я. Ливчак, Е. Я. Магачева, А. Н. Климов

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЛИПОПРОТЕИДОВ ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ

Лаборатория липидного обмена Института экспериментальной медицины АМН СССР,
Ленинград

Изучен химический состав липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) плазмы крови новорожденных. В апопротеиновом спектре ЛПВП новорожденных обнаружено снижение содержания ряда апопротеинов (apo A-I, apo A-II, apo D, apo C-III₂). Как в ЛПВП, так и в ЛПНП снижено содержание эстерифицированного и повышено содержание неэстерифицированного холестерина.

Ранее нами было отмечено значительное снижение активности лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) в пуповинной крови. При этом было показано, что снижение эстерифицирующей активности в плазме крови новорожденных обусловлено как недостатком фермента, так и структурными изменениями в липопротеидах новорожденных. Учитывая, что субстратом ЛХАТ являются липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) и принимая во внимание обнаруженное нами ранее уменьшение отношения эстерифицированного холестерина к свободному в ЛПВП новорожденного по сравнению с таковым у матери, в настоящем исследовании мы изучали апопротеиновый и липидный состав ЛПВП новорожденных. Так как ЛПВП являются донаторами эстерифицированного холестерина для липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [1], исследованию был подвергнут также липидный состав этого класса липопротеидов новорожденных.

Методы

Исследовали плазму крови, взятой из пупочного канатика новорожденного, локтевой вены матери-роженицы и здоровой женщины. Для изучения химического состава липопротеиды выделяли из плазмы матери и новорожденного последовательным ультрацентрифугированием [2]. Фракции ЛПНП и ЛПВП очищали повторным ультрацентрифугированием в плотностях 1,063 и 1,21 соответственно и диализовали 18 ч против 0,15 М NaCl, содержащего 0,001 М ЭДТА. Содержание белка во фракциях липопротеидов определяли по Лоури [3]. Триглицериды определяли на автоанализаторе АА-2 «Техникон».

Общий холестерин определяли в изопропаноловых экстрактах после их упаривания и проведения цветной реакции, согласно методу Абея и соавт. [4]. Свободный холестерин определяли после его осаждения дигитонином. Эстерифицированный холестерин вычисляли по разнице между общим и свободным. О количестве фосфолипидов судили по содержанию неорганического фосфора [5]. Чистоту выделенных фракций липопротеидов контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [6]. Для изучения апопротеинового спектра ЛПВП последние выделяли из плазмы новорожденного, матери-роженицы и здоровой женщины препаративным ультрацентрифугированием при 40 000 об/мин в течение 24 ч при 10°C. Все растворы содержали 0,001 М ЭДТА и имели pH 8,6. Делипидирование ЛПВП и разделение апопротеинов электрофорезом в полиакриламидном геле проводили по Кейну [7]. Электронная микроскопия фракции ЛПНП выполнена по Форте [8].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования апопротеинового спектра ЛПВП новорожденного, матери-роженицы и здоровой женщины (при использовании для электрофоретического разделения одинаковых количеств липопротеидного белка — 60 мкг) показали, что основная масса белка ЛПВП новорожденных сосредоточена в самой верхней широкой полосе, простирающейся от места локализации апо С-I до апо А-I (рис. 1). Основная часть этой широкой полосы захватывает место расположения богатого аргинином апопротеина (апо Е) и, по-видимому, отражает накопление последнего. В апопротеиновом спектре ЛПВП новорожденных резко снижена интенсивность и ширина полосы, соответствующей апопротеину А-I, ослаблена интенсивность полос, соответствующих апо С-II и апо С-III₁, полностью отсутствуют полосы, соответствующие апо А-II, апо D и апо С-III₂ (см. рис. 1). Полученные данные свидетельствуют об уменьшении в ЛПВП новорожденных содержания целого ряда апопротеинов. Известно, что апо А-I, апо D, апо С-I являются ксфакторами ЛХАТ-реакции [9—11], а апо А-II принимает участие в транспорте холестерина из периферических тканей в печень [11]. Более низкое содержание апо А-I и апо D в ЛПВП новорожденных, возможно, обуславливает в той или иной степени снижение активности ЛХАТ в пуповинной крови, а снижение содержания апо А-2 — накопление холестерина в эритроцитах новорожденного [6]. Следует отметить, что заметных различий в апопротеиновом спектре матери и здоровой женщины не выявлено.

Обнаруженные изменения в апопротеиновом спектре ЛПВП новорожденных — вероятное накопление апопротеина, богатого аргинином, и уменьшение концентрации остальных апопротеинов, особенно апо А-I, — весьма характерны для апопротеинового спектра ЛПВП при наследственной недостаточности ЛХАТ [12], недостаточности ЛХАТ при остром алкогольном гепатите [13] и для насcentных ЛПВП [14]. В настоящее время нельзя с уверенностью сказать, чем обусловлено снижение содержания апо А-I в ЛПВП новорожденных: репрессией синтеза этого апопротеина в печени или вытеснением его из липопротеидной частицы желчными кислотами подобно тому, как это происходит при образовании ЛП-Х при холестазе. Согласно гипотезе Гамильтона [1], желчные кислоты, накапливаясь

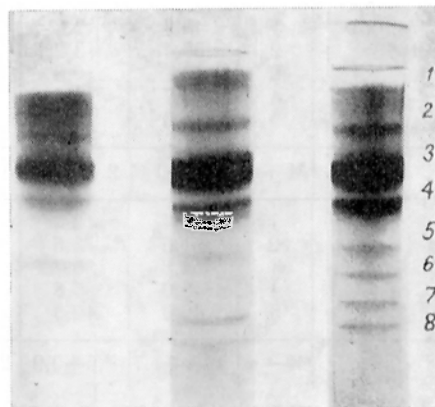


Рис. 1. Апопротеиновый спектр ЛПВП, выделенных ультрацентрифугированием из плазмы новорожденных (слева), рожениц (в центре) и здоровых женщин (справа).

1 — апо С-I (апо-сер); 2 — апо Е (апопротеин, богатый аргинином); 3 — апо А-I (апо глун-I); 4 — апо А-II (апо глун-II); 5 — апо D (тонкополосный апопротеин); 6 — апо С-II (апо глу); 7 — апо С-III₁ (апо ала₁); 8 — апо С-III₂ (апо ала₂).

в крови, могут вытеснять апо А-I с поверхности липопротеидной частицы, препятствуя тем самым присоединению ЛХАТ к последней. Имеются данные, согласно которым концентрация желчных кислот в пуповинной крови не отличается от таковой у взрослых [15]. Содержание ЛПВП, как и содержание других классов липопротеидов, у новорожденных ниже, чем у взрослых [16, 17]. Таким образом, у новорожденных количество молекул желчных кислот, приходящееся на одну липопротеидную частицу, должно быть

Т а б л и ц а 1

Состав ЛПВП новорожденных и матерей (в%)

Группа обследуемых	№ п/п	Белок	Триглицериды	Фосфолипиды	ХС _{общ}	ХС _{св}	ХС _{эф}	ХС _{эф} /ХС _{св}
Новорожденные	1	43,4	2,6	36,5	17,3	9,6	7,7	0,8
	2	50,4	3,2	23,5	22,7	11,9	10,8	0,9
	2	42,7	0,8	38,8	16,9	9,0	7,9	0,9
	4	43,7	1,9	37,9	16,3	9,1	7,2	0,8
	5	41,0	1,8	37,6	19,3	9,5	9,8	1,0
	$M \pm m$	44,2 \pm 1,6	2,1 \pm 0,4	35,0 \pm 2,9	18,5 \pm 1,2	9,8 \pm 0,5	8,7 \pm 0,7	0,9 \pm 0,04
Матери	1	48,4	9,0	24,3	18,3	5,8	12,5	2,2
	2	51,6	5,6	26,1	16,7	6,5	10,2	1,6
	3	54,8	6,7	20,0	18,6	5,6	13,0	2,3
	4	46,0	5,8	30,5	17,5	5,2	12,3	2,4
	5	46,0	10,3	29,6	14,1	4,5	9,6	2,1
	$M \pm m$	49,4 \pm 1,7	7,5 \pm 0,9	26,1 \pm 2,2	17,0 \pm 0,8	5,5 \pm 0,3	11,5 \pm 0,7	2,1 \pm 0,2

Примечание. Здесь и в табл. 2 ХС_{общ} — общий холестерин.

значительно выше, чем у взрослых. На основании этого можно предположить, что уменьшение содержания апо А-I в ЛПВП новорожденных может быть следствием вытеснения апопротеина желчными кислотами. Ранее мы показали, что отношение эфирсвязанного холестерина к свободному (ХС_{эф}/ХС_{св}) в α -липопротеидах (ЛПВП), выделенных по Бурштейну [18], в пуповинной крови в 1,6 раза ниже, чем в крови у матери, что свидетельствует о снижении эстерификации холестерина в ЛПВП новорожденного. Эти результаты побудили нас более полно изучить липидный состав ЛПВП новорожденных и матери, выделенных ультрацентрифугированием. При рассмотрении химического состава ЛПВП (табл. 1) прежде всего обращает на себя внимание повышение в ЛПВП новорожденных содержания неэстерифицированного холестерина (в 1,8 раза выше, чем у матери) и снижение концентрации эстерифицированного холестерина (в 1,3 раза по сравнению с таковой у матери). Отношение ХС_{эф}/ХС_{св} в ЛПВП новорожденных в 2,3 раза ниже, чем в ЛПВП матери. Содержание триглицеридов в ЛПВП новорожденных также ниже, чем в ЛПВП матери (в 3,6 раза). Концентрация белка в ЛПВП новорожденных ниже, а содержание фосфолипидов выше, чем в ЛПВП матери. Обнаруженные различия состава ЛПВП новорожденного и матери по содержанию белка, неэстерифицированного и эстерифицированного холестерина, отношению ХС_{эф}/ХС_{св} и содержанию триглицеридов статистически достоверны (во всех случаях $P < 0,05$).

Анализ химического состава ЛПВП позволяет заключить, что в ЛПВП новорожденных снижено содержание неполярных липидов (ХС_{эф} и триглицеридов), расположенных в ядре липопротеидной частицы, и увеличено содержание поверхностно расположенных полярных липидов (ХС_{св} и

фосфолипидов), что делает эти липопротеиды похожими на ЛПВП при наследственной недостаточности ЛХАТ (в последнем случае все эти изменения значительно более выражены) и на насцентные ЛПВП. Образование насцентных липопротеидов убедительно показано в экспериментах с перфузией печени крыс при одновременном введении ингибитора ЛХАТ — 5,5'-дитионитробензойной кислоты [15]. Насцентные ЛПВП отличаются от ЛПВП новорожденных более высоким содержанием триглицеридов [14].

Т а б л и ц а 2

Состав ЛПНП новорожденных и матерей (в %)

Группа обследованных	№ п.п	Блок	Триглицериды	Фосфолипиды	ХС _{общ}	ХС _{св}	ХС _{эф}	ХС _{эф} /ХС _{св}
Новорожденные	1	20,2	12,4	24,2	42,9	24,6	18,3	0,7
	2	17,5	16,1	32,9	33,3	18,9	14,4	0,8
	3	23,3	10,4	24,3	41,8	18,2	23,6	1,3
	4	21,8	21,2	26,7	30,1	16,5	13,6	0,8
	$M \pm m$	20,7 \pm 1,2	15,0 \pm 2,4	27,0 \pm 2,0	37,0 \pm 3,2	19,5 \pm 1,7	17,5 \pm 2,3	0,9 \pm 0,1
Матери	1	28,0	10,7	23,7	37,6	12,2	25,4	2,1
	2	26,7	12,7	23,9	36,7	12,8	23,9	1,8
	3	30,5	18,1	22,8	31,6	11,7	20,0	1,7
	4	26,4	16,9	23,6	33,1	11,1	24,5	2,2
	$M \pm m$	27,9 \pm 0,9	14,6 \pm 1,7	23,5 \pm 0,2	34,8 \pm 1,4	11,9 \pm 0,4	23,4 \pm 1,2	2,0 \pm 0,1

На основании изложенного механизм образования измененных ЛПВП у новорожденных можно представить следующим образом. Желчные кислоты, содержание которых по отношению к липопротеидам в плазме новорожденных повышено, конкурируют с апо А-I, вытесняя его с поверхности липопротеидной частицы. В результате происходит потеря апо- А-I и ЛХАТ не может присоединиться к липопротеидной частице. В нормальных условиях фермент присоединяется к ЛПВП через апо А-I и лишь после этого происходит эстерификация поверхностно расположенного свободного холестерина с перемещением эфира холестерина в неполярное ядро липопротеидной частицы. В ЛПВП новорожденных этот процесс нарушен, следствием чего является увеличение в них содержания полярных поверхностно расположенных липидов (свободного холестерина и фосфолипидов) и уменьшение неполярных ядерных липидов (эфиров связанного холестерина и триглицеридов).

Согласно современным представлениям, большая часть эстерифицированного холестерина ЛПНП образуется также в плазме крови путем транспорта эфиров холестерина с ЛПВП на ЛПНП [1, 19], т. е. косвенно благодаря ЛХАТ-реакции. Исходя из этих данных, можно ожидать в составе ЛПНП новорожденных наличие изменений, близких тем, которые мы обнаружили в ЛПВП. В связи с этим мы исследовали липидный состав ЛПНП новорожденных, выделенных ультрацентрифугированием. Из табл. 2 видно, что и в этой фракции липопротеидов новорожденного содержание неэстерифицированного холестерина в 1,6 раза выше, а эстерифицированного холестерина в 1,3 раза ниже, чем у матери. Отношение ХС_{эф}/ХС_{св} составляет 0,9, тогда как у матери — 2,0.

По содержанию триглицеридов, общего холестерина и фосфолипидов ЛПНП новорожденного не отличаются от ЛПНП матери. Содержание бел-

ка в ЛПНП новорожденного ниже, чем в ЛПНП матери, очевидно, за счет снижения апо-В.

Заслуживает внимания и тот факт, что у новорожденных изменен не только состав ЛПНП, но и морфология этого класса липопротеидов. При

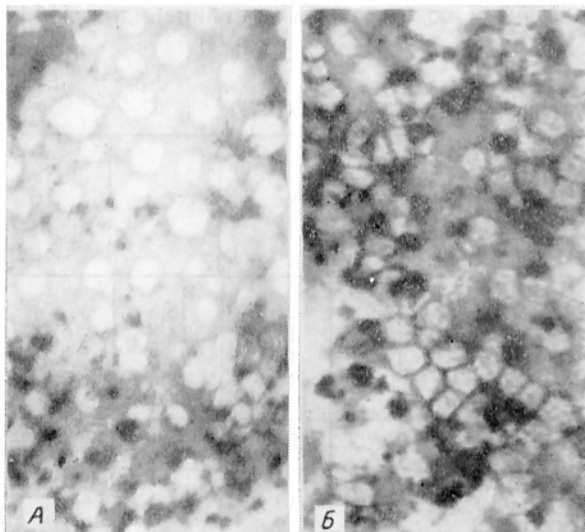


Рис. 2. Электронная микроскопия ЛПНП матери-ро-
женицы (А) и новорожденного (Б).

электронной микроскопии негативно окрашенные препараты ЛПНП новорожденных значительно отличаются от ЛПНП матери-ро-
женицы. Последние в основном имеют сферическую форму (рис. 2, А), а ЛПНП новорожденных полигональной формы с тенденцией к агрегированию (рис. 2, Б). В сообщении Винклера и соавт. [20] приведены данные о липидном составе липопротеидов новорожденных и обобщенные литературные данные о липидном составе липопротеидов взрослых (независимо от пола). Данные этих авторов о липидном составе липопротеидов новорожденных хорошо согласуются с нашими результатами.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о наличии выраженных изменений как в апопротеиновом, так и липидном составе ЛПВП и ЛПНП новорожденных. Какие из этих изменений являются причиной, а какие — следствием недостаточности ЛХАТ, покажут дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hamilton R. L., Kayden H. J. — In: The Liver: Normal and Abnormal Function. V. 5. New York, 1974, p. 532. — 2. Havel R. J., Eder H. A. — «J. clin. Invest.», 1955, v. 34, p. 1345. — 3. Lowry O. H., Rosenbrough N. J. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 4. Abell L. L. et al. — Ibid., 1952, v. 195, p. 357. — 5. Fiske C. H., Subbarow V. — Ibid., 1925, v. 66, p. 375. — 6. Климов А. И., Магачева Е. Я. и др. — «Вопр. мед. химии», 1976, с. 22, с. 346. — 7. Kane J. P. — «Analyt. Biochem.», 1973, v. 531, p. 350. — 8. Forte G. M., Nichols A. V. et al. — «Chem. phys. Lipids», 1968, v. 2, p. 396. — 9. Fielding C. J., Shore V. G. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1972, v. 46, p. 1493. — 10. Kostner G. — «Scand. J. clin. Lab. Invest.», 1974, v. 33, p. 19. — 11. Soutar A. K., Garner C. W. et al. — «Biochemistry (Wash.)», 1975, v. 14, p. 3057. — 12. McConathy W. J., Alaupovic P. et al. — «Biochim. biophys. Acta», 1973, v. 326, p. 406. — 13. Rogland J. B. et al. — «Circulation», 1976, v. 54, abstr. 100. — 14. Hamilton R. L., Williams M. C. et al. — «J. clin. Invest.», 1976, v. 58, p. 667. — 15. Miettinen T. A. — In: The Bile Acids Chemistry, Physiology and Metabolism. New York, 1973, p. 207. — 16. Russ E. N., Eder K. A., Barr D. P. — «J. clin. Invest.», 1954, v. 33, p. 1662. — 17. Wille L. E., Phillips G. B. — «Clin. chim. Acta», 1971, v. 34, p. 457. — 18. Burnstein M., Samaille J. — Ibid., 1960, v. 5, p. 609. — 19. Faergeman O., Havel R. J. — «J. clin. Inves.», 1975, v. 55, p. 1210. — 20. Winkler L. et al. — «Artery», 1976, v. 2, p. 297.

Поступила 24/1 1977 ■

Г. В. Белобрагина, Л. А. Медведев

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РЯДА КОМПОНЕНТОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ЛЕГКИХ КРЫС В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

Научно-исследовательский институт гигиены труда и профессиональных заболеваний,
Свердловск

Исследована динамика накопления в легких крыс в возрасте от 7 дней до 32 мес растворимого и нерастворимого коллагена, веществ, входящих в состав соединительной ткани (гликозаминогликанов, гликопротеидов и липидов), а также участвующих в ее синтезе нуклеиновых кислот. Выделено три этапа, соответствующие юному, зрелому и старческому возрасту крыс. Юный возраст характеризуется интенсивным коллагенообразованием и высоким содержанием растворимых фракций в коллагене. В зрелом возрасте наблюдается статическое равновесие между растворимыми и нерастворимыми фракциями коллагена, а также постоянство в относительном содержании РНК, гексуроновых кислот, гексоз, тирозина, сиаловых кислот и общих липидов. Старению, сопровождающемуся склерозированием ткани, увеличением нерастворимых форм коллагена и уменьшением растворимых, предшествует уменьшение концентрации ДНК и увеличение содержания фосфолипидов. В периоде старения снижается относительное содержание гексуроновых кислот (гликозаминогликанов).

Основная часть работ, в которых содержатся отдельные данные по содержанию в легких коллагена, неколлагеновых белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот и липидов, проводилась с целью получения контрольных результатов для изучения действия на легкие тех или иных факторов, поэтому осуществлялась на взрослых животных, причем не достигающих в конце эксперимента старческого возраста [1—4].

В других работах [5, 6] при изучении старения соединительной ткани ряда органов и легких не был изучен самый ранний и поздний возраст; при этом был сделан вывод, что содержание нерастворимого коллагена и неколлагеновых белков с возрастом не изменяется.

С другой стороны, имеются данные [7], указывающие на постоянное увеличение концентрации коллагеновых белков до определенного возраста (соответствующего приблизительно 240 г массы крысы), после чего она достигает постоянной предельной величины.

Исследование растворимых фракций коллагена у интактных животных также встречается в единичных сообщениях. Так, Русова [8] определила содержание коллагена, растворимого в 0,45 М NaCl. Васильева [3] обнаружила незначительные различия в содержании фракций коллагена, растворимого в нейтральном солевом растворе, у взрослых животных в возрасте 1 и 6½ мес.

Методика

Мы проводили исследование на животных в возрасте от 7 дней до 32 мес. Определяли содержание оксипролина [9] в коллагене, растворимом и нерастворимом в 0,45 М NaCl. Наряду с этим с 67-го дня изучали динамику накопления гликопротеидов гексоз-антроновым методом, тирозина [10] и сиаловых кислот [11]. Кроме того, определяли содержание гексуроновых кислот, являющихся показателем наличия гликозаминогликанов [12]. Одновременно исследовали количество ДНК [13], РНК (по реакции рибозы с орцином) и их суммарное количество [14]. Определяли гравиметрическим методом количество суммарных липидов, а также фосфолипидов [15], входящих в сравнительно большом количестве в состав соединительной ткани [10, 16—18].

Результаты и обсуждение

В накоплении коллагена в легких крыс в процессе постнатального онтогенеза можно выделить три этапа, которые соответствуют юному, зрелому и старческому возрасту. Юный возраст (7—75 дней) характеризуется интенсивным коллагенообразованием: наблюдается значительный прирост нерастворимых фракций коллагена (табл. 1), содержание фракций, растворимых в нейтральном солевом растворе, уменьшается, их количество в

общих склеропротеинах в этот период самое высокое и на 7-й день составляет 33,3% [19].

В зрелом возрасте (75 дней — 14 мес) прирост нерастворимых фракций резко снижается и практически отсутствует наряду с уменьшением фракций, растворимых в нейтральном солевом растворе; уровень их в общем количестве составляет 8,1%. Старение сопровождается некоторым повышением со-

держания коллагена с увеличением количества нерастворимых фракций и уменьшением растворимых. Относительные пропорции последних в общем коллагене становятся еще меньшими и составляют примерно 5,5%.

Следовательно, при образовании коллагена в легких существует обратная корреляция между динамикой накопления растворимых и нерастворимых его фракций: увеличение нерастворимых фракций происходит на фоне уменьшения растворимых (юный и старческий возраст). Статическое равновесие в зрелом возрасте наблюдается одновременно для обеих фракций.

Логично полагать, что в зрелом возрасте процессы метаболизма уравновешиваются с процессами катаболизма. В легких человека отмечено нарастание в первые десятилетия жизни количества коллагена от 12 до 24% с сохранением его на этом уровне до 70 лет [20]. Полученные данные являются подтверждением образования зрелых форм коллагена в результате созревания незрелых фракций, причем последний процесс преобладает над синтезом фибриллярных белков, следствием чего является уменьшение количества растворимого коллагена. Разница между этими процессами в юном и старческом возрасте заключается, во-первых, в различных темпах их протекания. Синтез и образование зрелых форм коллагена на ранних стадиях постнатального онтогенеза происходят в 35 раз быстрее, чем при старении, т. е., надо полагать, здесь наблюдается в первую очередь более быстрый оборот фракций, растворимых в нейтральном солевом растворе. Во-вторых, нарастание количества коллагена при старении после периода статического равновесия происходит без увеличения количества растворимых его форм, оно, наоборот, сопровождается их уменьшением как по общим показателям (табл. 2), так и, что особенно важно, по количеству их в общем коллагене (от 8,1 до 5,5%). Отсюда логично предположить, что при старении прежде всего наблюдается усиление процесса созревания коллагена, вероятно, в результате накопления с возрастом в организме веществ, обладающих дубящим свойством [21].

В зрелом возрасте отмечается постоянство не только обеих фракций коллагена, но и РНК, гексуриновых кислот, гексоз, тирозина, сиаловых кислот и общих липидов (см. табл. 2). Соответственно этому обеспечивается постоянство отношений этих компонентов к оксипролину (табл. 3).

Исключение из общего правила составляет концентрация в легких ДНК, содержание которой в конце зрелого возраста начинает уменьшаться, одновременно снижается и соответствующий индекс, т. е. при нарастании склероза ослабевает «клеточность» ткани.

Т а б л и ц а 1
Динамика накопления фракций коллагена

Возраст крыс	Прирост нерастворимых фракций, мг (по оксипролину)		Убыль растворимых фракций, мг (по оксипролину)		
	относительный		абсолютный	относительная	
	общий	за 1 мес	общий	общая	за 1 мес
Юный (7—75 дней)	+1,666	+0,8	+3,012	—0,229	—0,11
Зрелый (75 дней—14 мес)	—0,222	—	+0,741	—0,005	—
Старческий (14—32 мес)	+0,421	+0,023	+1,984	—0,046	—0,0025

С другой стороны, начиная с 5 мес, отмечается значительное увеличение содержания в клетках фосфолипидов, опережающее появление дополнительных количеств коллагена — $4,61 \pm 0,04$ мг на 100 г; $P = 5\%$. Отношение фосфолипиды/оксипролин через 5 мес составляет $4,67 \pm 0,15$ ($P = 1,3\%$).

Т а б л и ц а 2
Содержание исследованных метаболитов, мг на 100 г ($M \pm m$)

Метаболиты	75 дней	14 мес	32 мес
Оксипролин растворимого коллагена P^*	$0,209 \pm 0,02$	$0,204 \pm 0,01$	$0,158 \pm 0,01$ 1,3%
Оксипролин нерастворимого коллагена P	$2,544 \pm 0,22$	$2,322 \pm 0,07$	$2,743 \pm 0,16$ 4%
РНК P	$2,05 \pm 0,10$	$1,87 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,08$ 0,1%
Гексуроновые кислоты P	$1,03 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,05$ 1,3%
Гексозы	$1,17 \pm 0,08$	$1,18 \pm 0,08$	$1,17 \pm 0,14$
Тирозин	$3,62 \pm 0,27$	$3,68 \pm 0,18$	$3,53 \pm 0,18$
Сиаловая кислота	$0,32 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,02$
Общие липиды P	$13,8 \pm 0,31$	$16,7 \pm 0,77$	$11,4 \pm 0,61$ <0,1%
ДНК	$2,95 \pm 0,15$	$2,46 \pm 0,13$ $P^* = 3\%$	$2,09 \pm 0,09$ $P = 5\%$
Фосфолипиды P	$3,78 \pm 0,37$	$5,28 \pm 0,22$ 0,5%	$5,45 \pm 0,23$ (19 мес)

* P дано по сравнению с предыдущим сроком в случае значимых различий.

Последующему усилению синтеза коллагена предшествует увеличение, начиная с 11 мес, цитоплазматически-ядерного коэффициента, т. е. в каждой клетке синтез РНК предшествует синтезу волокнистых белков

Т а б л и ц а 3
Величина отношений каждого исследованного метаболита к оксипролину и отношение РНК/ДНК ($M \pm m$)

Отношение	75 дней	14 мес	32 мес
РНК/оксипролин P	$1,88 \pm 0,09$	$1,66 \pm 0,11$	$1,00 \pm 0,14$ 0,4%
Гексуроновые кислоты/оксипролин P	$0,96 \pm 0,17$	$0,82 \pm 0,04$	$0,56 \pm 0,08$ 1,3%
Гексозы/оксипролин	$1,11 \pm 0,07$	$1,05 \pm 0,10$	$0,88 \pm 0,12$
Тирозин/оксипролин P	$2,92 \pm 0,44$	$3,26 \pm 0,19$	$2,70 \pm 0,42$ 1,6%
Сиаловые кислоты/оксипролин	$0,27 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,04$
Общие липиды/оксипролин P	$13,78 \pm 3,72$	$19,19 \pm 1,29$	$10,34 \pm 1,44$ 0,3%
ДНК/оксипролин P	$2,71 \pm 0,14$	$2,19 \pm 0,16$ 3%	$1,47 \pm 0,28$ <0,1%
Фосфолипиды/оксипролин P	$2,84 \pm 0,51$	$5,98 \pm 0,63$ 0,3%	$6,49 \pm 0,54$ (19 мес)
РНК/ДНК P	$0,695 \pm 0,009$	$0,740 \pm 0,012$ 1,3%	$0,645 \pm 0,070$

($0,740 \pm 0,03$); при этом индекс сохраняется приблизительно на одном уровне до 19 мес, после чего значительно снижается, и у старых животных (32 мес) его величина становится меньше исходной.

Накопление коллагена на этапе старения происходит на фоне существенно не различающихся между собой концентраций ДНК, РНК, общих липидов, фосфолипидов, гексоз, тирозина и сиаловых кислот. Лишь относительное содержание гексуроновых кислот во время всего периода старения снижается. Вместе с тем у старых животных при выраженном склерозе (32 мес) концентрация всех исследованных веществ, кроме входящих в гликопротеиды (гексозы, тирозин и сиаловые кислоты), снижается и становится меньше исходной.

Отсюда логично сделать вывод о наблюдаемом в старческом возрасте снижении индексов ДНК/оксипролин, РНК/оксипролин, гексуроновые кислоты/оксипролин, тирозин/оксипролин и липиды/оксипролин. Отношение гексоз к оксипролину также имеет тенденцию к уменьшению; фосфолипидно-оксипролиновый индекс в это время мы не определяли. Можно предполагать, что он также снижается, хотя в предыдущий срок и отмечалась тенденция к росту индекса, наблюдаемая, однако, и для липидно-оксипролинового коэффициента ($20,91 \pm 0,88$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Джангозина Д. М. Коллагеновые и «неколлагеновые» белки, мукополисахариды и медь легочной ткани при экспериментальном пневмокопизоле. Автореф. дис. канд. Караганда, 1968. — 2. Павлова И. В. и др. — «Гиг. труда», 1970, № 8, с. 25—29. — 3. Васильева Г. Н. — «Вопр. мед. химии», 1971, № 3, с. 277—281. — 4. Веретинская А. Г. — «Гиг. труда», 1972, № 2, с. 56—58. — 5. McGavack T. H., Kao K. T. — «Exp. Med. Surg.», 1960, v. 8, p. 104—123. — 6. Idem. — «J. Am. Geriatrics. Soc.», 1963, v. 11, p. 1024—1052. — 7. Хвапил М. (Chvapil M.) — «Гиг. труда», 1960, № 4, с. 33—38. — 8. Русова Т. В. — В кн.: Пороки развития, реактивные изменения и хронические заболевания легких. М., 1969, с. 164—165. — 9. Stegemann H. — «Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.», 1958, Bd 311, S. 41—45. — Слущкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л., 1969. — 11. Титаев И. А., Ларский Э. Г., Борисова Т. П. и др. — «Лаб. дело», 1964, № 4, с. 201—204. — 12. Bitter T., Muir H. M. — «Analyt. Biochem.», 1962, v. 4, p. 330—334. — 13. Burton K. — «Biochem. J.», 1956, v. 62, p. 315. — 14. Спирин А. С. — «Биохимия», 1958, № 5, с. 656—662. — 15. Балаховский С. Д. Микрхимический анализ крови и его клиническое значение. М., 1932. — 16. Noble N. L., Boucek R. J. — «Circulat. Res.», 1955, v. 3, p. 344, 350. — 17. Collet A., Daniel-Moussard H. — «Rev. franc. Etudes Clin. Biol.», 1961, v. 6, p. 897—904. — 18. Reynier J., Piercy G., Lemarchands H. — «C. R. Soc. Biol. (Paris)», 1962, v. 156, p. 678—680. — 19. Брагина Г. В., Медведев Л. А. — «Вопр. мед. химии», 1974, № 1, с. 52—55. — 20. Buddeske E. — In: Grundfragen aus der silikoseforschung. Bd 5. Bochum, 1963, S. 173—188. — 21. Chvapil M., Deyl Z. — «Gerontologia (Basel)», 1965, v. 10, p. 199.

Поступила 8/II 1977 г.

DYNAMICS OF ALTERATIONS IN RAT LUNG CONNECTIVE TISSUE DURING POSTNATAL ONTOGENESIS

G. V. Belobragina, L. A. Medvedev

Research Institute of Labour Hygiene and Professional Diseases, Sverdlovsk

Content of soluble and insoluble collagen, glycosamine glycans, glycoproteins, lipids and nucleic acids was studied in rat lungs during postnatal ontogenesis (up to 32 months). Three age groups of animals, corresponding to juvenile, mature and old age, were used. Intensive collagenoformation and high content of soluble collagen fraction were found in animals of juvenile age. Mature age was characterized by static equilibrium between soluble and insoluble collagen fractions as well as by stabilization in concentration of RNA, hexuronic acids, hexoses, tyrosine, sialic acids and total lipids. Decrease of DNA concentration with simultaneous increase in phospholipid content preceded in ageing the alteration in collagen composition — elevation in insoluble and loss of soluble its fractions. At the ageing period content of glycosamines was relatively decreased but concentration of other substances varied slightly.

В. С. Рудник

ФОСФОФРУКТОКИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЧУМНОГО МИКРОБА

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока

Синтез фосфофруктокиназы (ФФК) снижается при повышении температуры культивирования чумного микроба с 28 до 37°C. Аэрирование питательной среды слабо влияет на продукцию фермента. Глюкоза, внесенная в жидкую среду культивирования, снижает синтез ФФК у вирулентного и повышает у авирулентного штамма. Активность ФФК чумного микроба ингибируют АТФ, цитрат, 3-фосфоглицерат, ионы Ca^{2+} и Mn^{2+} . АМФ и в меньшей степени АДФ ослабляют действие АТФ и цитрата на ФФК, однако при наличии в реакционной смеси АТФ в неингибирующих концентрациях эти соединения снижают активность фермента.

Фосфофруктокиназа (ФФК) является важнейшим регуляторным ферментом, определяющим общую скорость гликолиза [1—5]. Отдельные наблюдения [6, 7] свидетельствуют о нарушении пастеровского эффекта в клетках чумного микроба, однако сведения о регуляции биосинтеза и активности ФФК у этого микроорганизма в литературе отсутствуют. Поэтому представлялось целесообразным проследить влияние различных условий на синтез ФФК чумным микробом, а также влияние некоторых веществ на активность фермента.

Методика

Исследование проводили на вирулентном штамме чумного микроба 1978 и вакцинном ЕВ-229. Культуры выращивали на агаре Хоттингера рН 7,2 при 28°C в течение 48 ч, в бульоне Хоттингера рН 7,1—7,2 и в этом же бульоне, обогащенном глюкозой (1%), при 28 и 37°C в течение 24 ч. Бульонные культуры выращивали стационарно (относительно анаэробные условия) и при шуттелировании (эффективная аэрация). В качестве ферментного препарата использовали цитоплазму, для получения которой дважды отмытые физиологическим раствором клетки разрушали в ультразвуковом дезинтеграторе MSE-150 Watt в течение 30 мин при 10 кГц с последующим центрифугированием на холоду при 130 000 g в течение 80 мин. Активность ФФК определяли колориметрическим [8] и спектрофотометрическим [9] методами. За единицу активности в первом случае принимали прирост оптической плотности при 490 нм на 0,001 на 1 мг белка ферментного препарата за период инкубации (30 мин), во втором случае активность ФФК выражали в микромолях НАД·Н₂, убывшего в 1 мин на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение

Наиболее высокая активность ФФК отмечена у агаровых культур чумного микроба. В жидких питательных средах синтез ФФК, как правило, снижается. Активность ФФК достоверно ($P < 0,01$) выше у культур чумного микроба, выращенных при 28°C по сравнению с культурами, выращенными при 37°C (табл. 1).

Влияние аэрации на продукцию ФФК выражено крайне слабо и своеобразно для конкретных условий культивирования чумного микроба. Ожидаемое снижение синтеза ФФК при росте в бульоне Хоттингера в аэробных условиях наблюдается только в одном случае — у вирулентного штамма, культивируемого при 28°C. Эффективная аэрация среды культивирования при 37°C (бульон Хоттингера) или не влияет на продукцию ФФК (вирулентный штамм), или повышает ее (авирулентный штамм).

При обогащении бульона Хоттингера глюкозой синтез ФФК у вирулентного штамма закономерно снижается (исключение составляют культуры, выросшие в аэробных условиях при 28°C), тогда как у авирулентного возрастает (за исключением культур, выращенных при 37°C в аэробных условиях).

Двухвалентные ионы ингибируют активность ФФК чумного микроба (табл. 2). Наиболее выражен данный эффект у ионов марганца. Неорганический фосфор снижает активность ФФК только в очень высоких (нефизио-

Таблица 1

Активность ФФК чумного микроба при различных условиях его культивирования ($M \pm m$)

Температура, градусы	Среда культивирования									
	бульон Хоттингера				бульон Хоттингера + 1% глюкозы				агар Хоттингера	
	28		37		28		37		28	
Кислородный режим	стационарно	встряхивание	стационарно	встряхивание	стационарно	встряхивание	стационарно	встряхивание		
Вирулентный штамм	54,9 \pm 3,4	26,1 \pm 1,5	26,5 \pm 1,8	27,4 \pm 1,3	39,4 \pm 2,4	43,8 \pm 3,5	14,4 \pm 0,8	22,6 \pm 1,0		
Авирулентный штамм	41,4 \pm 7,2	34,8 \pm 1,8	23,6 \pm 1,4	43,8 \pm 4,1	65,7 \pm 8,2	48,2 \pm 5,6	36,3 \pm 1,9	21,3 \pm 2,2		

Примечание. Реакционная смесь общим объемом 1,5 мл содержала (в микромолях): АТФ — 1,68, фруктозо-6-фосфат натрия — 6,0, фтористый натрий — 36,0, монобутоксусная кислота — 0,2, хлористый магний — 15,0, сернокислый марганец — 0,21, борно-боратный буфер рН 7,4—100,0, избыток алдолазы и ферментный препарат. В контроле раствор фруктозо-6-фосфата заменяли водой. Пробы инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Образовавшийся диоксисацетон-фосфат определяли колориметрически с 2,4-динитрофенилгидразином.

логических) концентрациях. Фермент чумного микроба проявляет выраженную зависимость от ионов магния. Наиболее благоприятным для фермента является соотношение концентраций ионов магния и АТФ, равное 1 : 10. Значительное увеличение содержания Mg^{2+} (до 50,0 ммоль) при сохранении концентрации АТФ (0,56 ммоль) ведет к резкому ингибированию ФФК.

Моновалентные катионы (K^+ , Na^+ и NH_4^+) на активность ФФК влияния не оказывают. В этом отношении фермент чумного микроба резко отличается от аналогичного фермента из других источников [2,10—12].

Скорость фосфофруктокиназной реакции максимальна при концентрации АТФ от 0,2 до 0,8 ммоль. Увеличение количества АТФ в пробе приводит к снижению активности ФФК (см. табл. 2). Так же как и у ФФК животного происхождения [13—15], ингибирующее действие АТФ на фермент чумного микроба ослабляет АМФ и отчасти АДФ. Так, если при концентрации АТФ 3,3 и 6,6 ммоль активность ФФК тормозится на 61,5 и 100,0% соответственно, то при введении АМФ (2,3) ммоль в пробу угнетающее действие АТФ снижается до 12,2 и 61,5% соответственно (см. табл. 2). Следует отметить, однако, что при наличии в реакционной смеси АТФ в неингибирующем количестве АМФ и АДФ снижают активность ФФК чумного микроба. Характерно, что даже при очень низких соотношениях концентраций АТФ : АДФ (порядка 0,11) активность ФФК чумного микроба заметно ингибируется. Последнее, видимо, не случайно, так как эффективность окислительного фосфорилирования в клетке чумного микроба крайне низкая [16].

ФФК бульонных культур (стационарный рост при 28°C) несколько более чувствительна к ингибирующему действию АТФ, чем фермент агаровой культуры.

Из испытанных метаболитов гликолиза только 3-фосфоглицерат обладал угнетающим действием на активность ФФК чумного микроба. Фосфенолпируват в физиологических концентрациях не оказывал влияния на скорость реакции.

Влияние цитрата на ФФК изучали на модели вирулентного и авирулентного штаммов. Фермент агаровой культуры не ингибируется лимоннокислым натрием в физиологических концентрациях: при концентрации 6,7 ммоль активность фермента сохраняется полностью, при 13,0 ммоль снижается на 58,5% и при 33,0 ммоль падает до нуля. ФФК бульонной культуры, выращенной стационарно при 28°C, более чувствительна к данному метаболиту цитратного цикла: при концентрации 3,3 ммоль активность фермента не изменяется и при 6,7 ммоль снижается на 47,7%. Фермент бульонных культур, выращенных в аэробных условиях при 37°C, ингибируется при физиологических концентрациях, при этом у вирулентного штамма в боль-

Т а б л и ц а 2

Влияние некоторых веществ на фосфофруктокиназную активность чумного микроба штамма ЕВ-229

Добавляемый ингредиент	Содержание, ммоль	Ингибирование фосфофруктокиназой активности, %	
		агаровая 48-часовая культура, выращенная при 28°	бульонная 24-часовая культура, выращенная стационарно при 28°C
АТФ	0,2—0,8	0	0
	1,67	28,4	51,4
	3,33	61,5	66,1
	6,66	100,0	100,0
АТФ+АМФ	3,33+2,30	12,2	—
	6,66+2,30	61,5	—
АМФ*	1,30	9,5	—
	5,30	43,3	—
АДФ*	5,30	29,1	—
3-Фосфоглицерат	1,80	36,6	41,4
Фосфоенолпируват	0,16	0	0
	5,0	0	0
Фосфат неорганический	0,25—2,5	0	—
	25,0	80,0	—
Mn ²⁺	0,52	41,2	—
Ca ²⁺	0,52	12,2	—
K ⁺	0,5—40,0	0	—
Na ⁺	0,5—40,0	0	—
NH ₄ ⁺	0,5—40,0	0	—

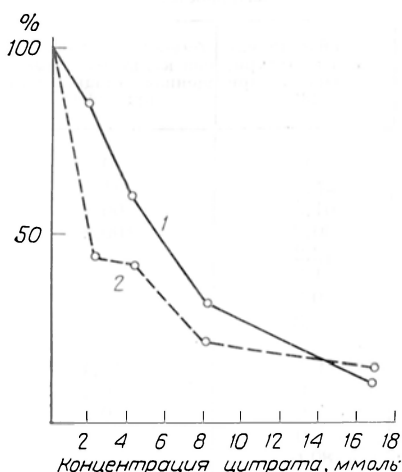
П р и м е ч а н и е. Одна звездочка в реакционной смеси 0,56 ммоль АТФ. Реакционная смесь содержала (в микромолях): НАДН₂ — 0,5, MgCl₂ — 30,0, фруктозо-6-фосфат натрия — 6,0, АТФ — 1,68, арсенат натрия — 0,73, глицил-глициновый буфер рН 7,5—150,0, избыток альдолазы, триозофосфатизомеразы и глицерофосфатдегидрогеназы, цитоплазма (0,5 мг белка) и вода — до 3,0 мл. В контроле раствор фруктозо-6-фосфата заменяли водой. Ход реакции регистрировали при 340 нм на СФ-16. Единицы активности ФФК даны в тексте.

шей степени, чем у авирулентного (см. рисунок). АМФ ослабляет ингибирующий эффект цитрата на ФФК. Так, если при концентрации цитрата 33,0 ммоль ФФК агаровой культуры полностью перестает функционировать, то введение в реакционную смесь 2,3 ммоль АМФ позволяет восстановить 22% активности фермента.

Как и аналогичный фермент из других источников, ФФК чумного микроба проявляет комплекс аллостерических свойств. Цитрат и АТФ в определенных условиях могут служить физиологическими ингибиторами ФФК чумного микроба. По чувствительности к ингибирующему действию цитрата фермент из клеток чумного микроба можно сравнить с ФФК других микробов [12], но не эукариотов [13]. Действие цитрата на ФФК чумного микроба ослабляется АМФ, а действие АТФ — АМФ и АДФ. Вместе

с тем в присутствии АТФ в неингибирующем количестве АМФ и АДФ ингибируют ФФК. Аналогичное действие АМФ на ФФК наблюдали на модели фермента из семян гороха [3], кишечной палочки [10] и дрожжей [17]. Метаболиты гликолиза также могут лимитировать скорость фосфофруктокиназной реакции у чумного микроба. Об этом свидетельствует факт ингибирования активности фермента 3-фосфоглицератом.

Полученные данные свидетельствуют, что активность ФФК чумного микроба может регулироваться метаболитами дыхания и гликолиза. Вместе с тем заметного снижения продукции ФФК при росте клеток в аэробных условиях не происходит. Этот факт следует, по-видимому, расценивать как доказательство того, что дыхание в клетках чумного микроба не способно полностью выключать гликолиз. Подобный вывод подтверждают и данные Голубинского и соавт. [7], показавших, что в аэробных условиях на 1 моль использованной глюкозы чумной микроб накапливает 1,1 моль лактата и потребляет при этом только 1,3 моль кислорода. Причины отсутствия (или невыраженности) пастеровского эффекта в клетках чумного микроба пока неясны. Возможно, что одной из них является неэффективность метаболитов дыхания как ингибиторов ФФК чумного микроба. Для повышения чувствительности к цитрату и АТФ у ФФК чумного микроба, по-видимому, требуется предварительная адаптация, которая происходит при росте клеток в бульоне в аэробных условиях.



Влияние цитрата на активность ФФК чумного микроба.

Культуры выращивали в бульоне Хоттингера при 37° С в аэробных условиях. 1 — авирулентный штамм ЕВ-229; 2 — вирулентный штамм 1978.

и соответственно с 7,1 до 6,6 при 37°С). Это согласуется с наблюдением [6], подтверждавшим, что в аэробных условиях чумной микроб утилизирует лишь вдвое меньше глюкозы, чем в анаэробных, в то время как известно, что при полном переключении с гликолиза на дыхание потребность в глюкозе сокращается во много раз больше.

Таким образом, на основании имеющихся данных можно представить следующую ориентировочную схему сопряжения гликолиза и дыхания в клетках чумного микроба. Гликолиз через аллостерический фермент ФФК ограниченно регулируется метаболитами дыхания. Чувствительность к негативным эффекторам — цитрату и АТФ — возрастает при росте клеток чумного микроба в условиях, максимально благоприятных для дыхания (аэрация, 37°С). Однако даже в этих условиях гликолиз доминирует над дыханием и значительно опережает его, поскольку необходимой концентрации АТФ и цитрата для эффективного торможения ФФК в клетке чумного микроба, по-видимому, не создается. Низкий клеточный пул метаболитов дыхания связан, вероятно, с низкой активностью некоторых ферментов цикла трикарбоновых кислот и низкой эффективностью окислительного фосфорилирования [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Paetkan V., Lardy H. A. — «J. biol. Chem.», 1967, v. 242, p. 2035—2042. — 2. Layzer R. B., Rowland L. P., Bank W. J. — Ibid., 1969, v. 244, p. 3823—3831. — 3. Kelly G. J., Turner J. F. — «Biochem. J.», 1969, v. 115, 481—487. — 4. Betz A., Rottger U., Kreuzberg K. H. — «Arch. Mikrobiol.», 1975, Bd 103, S. 123—126. — 5. Robertson D. C., McCullough W. G. — «Arch. Biochem.», 1968, v. 127, p. 445—456. — 6. Дроздовская Ф., 1951. Цит. Домарадский И. В. — «Изв. Иркутск. противочумного ин-та Сибири и Дальнего Востока», 1958, т. 18, с. 155—170. — 7. Голубинский Е. П., Рублев Б. Д., Фрунзе О. В. — «Пробл. особо опасных инфекций», 1971, № 5, с. 87—92. — 8. Sibley J. A., Lehninger A. L. — «J. biol. Chem.», 1949, v. 177, p. 859. — 9. Richards O. C., Rutter W. J. — Ibid., 1961, v. 236, p. 3177—3184. — 10. Atkinson D. E., Walton G. M. — Ibid., 1965, v. 240, p. 757—763. — 11. Uyeda D., Kurooka S. — Ibid., 1970, v. 245, p. 3315—3324. — 12. Marschke C. K., Berrnlohr R. W. — «Arch. Biochem.», 1973, v. 156, p. 1—16. — 13. Underwood A. H., Newsholme E. A. — «Biochem. J.», 1965, v. 95, p. 868—875. — 14. Hickman P. E., Weidemann M. — «FEBS Letters», 1973, v. 38, p. 1—3. — 15. Tsai M. V., Kemp R. G. — «J. biol. Chem.», 1974, v. 249, p. 6590—6596. — 16. Голубинский Е. П., Рублев Б. Д., Кирдеев В. К. — «Вопр. мед. химии», 1971, № 5, с. 512. — 17. Tamaki N., Hess B. — «Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.», 1975, Bd 356, S. 399—415.

Поступила 22/II 1977 г.

THE PHOSPHOFRUCTOKINASE ACTIVITY IN PESTILENTIAL MICROBE

V. S. Rudnik

Siberian and Far-Eastern Research Anti-Plague Institute, Irkutsk

Synthesis of phosphofructokinase was decreased in pestilential microbe if cultivation temperature was increased from 28° to 37°. Aeration of cultural fluid effected slightly on the enzyme production. Glucose, added to cultural fluid, decreased synthesis of phosphofructokinase in virulent strain and increased it in avirulent one. Phosphofructokinase activity from pestilential microbe was inhibited by ATP, citrate, 3-phosphoglycerate, by Ca^{2+} and Mn^{2+} . AMP and lesser ADP reduced the effect of ATP and citrate on the enzyme, but when ATP was maintained in reaction mixture at non-inhibitory concentration these substances decreased phosphofructokinase activity.

УДК 616.13-004.6-092.9-085.37:547.963'915

А. Н. Климов, Т. Н. Ловягина, В. А. Нагорнев, Ю. Н. Зубжицкий,
Л. Г. Петрова-Маслакова, Э. Б. Баньковская, Е. Я. Маграчева,
И. А. Олейник

О ПРИРОДЕ ЛИПОПРОТЕИДНОГО АНТИГЕНА, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА РАЗВИТИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗУ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ИМ НОВОРОЖДЕННЫХ КРОЛИКОВ

Отделы атеросклероза им. акад. Н. Н. Аничкова и микробиологии и иммунологии Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Показано, что при иммунизации новорожденных кроликов различными фракциями атерогенных липопротеидов, выделенных из сыворотки крови взрослых кроликов с экспериментальной гиперхолестеринемией, устойчивость к атеросклерозу у иммунизированных животных развивается в случае использования в качестве антигена липопротеидов очень низкой плотности.

В предыдущих исследованиях [1, 2] было показано, что иммунизация новорожденных кроликов суммарной фракцией гомологичных β - и пре- β -липопротеидов (β -ЛП и пре- β -ЛП), выделенных по Бурштейну из плазмы крови или аорты взрослых кроликов с экспериментальным атеросклерозом, приводит к созданию у иммунизированных животных толерантности к экспериментальному атеросклерозу в 65—70% случаев. Применение для им-

мунизации кроликов суммарной фракции β -ЛП и пре- β -ЛП было связано с тем, что у этого вида животных при развитии экспериментальной гиперхолестеринемии происходит быстрое нарастание в плазме крови не столько β -ЛП, сколько пре- β -ЛП, причем последние резко обогащаются холестерином. Вполне вероятно, что у кроликов атерогенностью обладают не только β -ЛП, но и пре- β -ЛП. С другой стороны, из сыворотки крови кроликов с экспериментальным атеросклерозом выделен специфический иммунный комплекс, содержащий β -ЛП или пре- β -ЛП в качестве антигена и IgG в качестве антитела [3]. До сих пор оставалось, однако, неясным, какой из двух упомянутых липопротеидов может быть ответственным за создание толерантности к атеросклерозу при иммунизации новорожденных животных. Выяснение этого вопроса имеет принципиальное значение для установления природы антигена, принимающего участие в образовании специфического иммунного комплекса, инициирующего или ускоряющего развитие экспериментального атеросклероза. В предыдущих исследованиях, как уже отмечалось, для выделения суммарной фракции β -ЛП и пре- β -ЛП использовали метод Бурштейна, основанный на осаждении этих классов липопротеидов гепарином в присутствии ионов кальция. Очистка выделенных таким методом липопротеидов путем переосаждения и длительного диализа (2—3 сут) не дает гарантии достаточно хорошего освобождения последних от примеси гепарина. Указанное обстоятельство также затрудняет толкование полученного иммунологического эффекта.

Перечисленные соображения побудили нас провести дополнительные исследования по иммунизации новорожденных животных очищенными гомологичными липопротеидами, выделенными методом ультрацентрифугирования.

М е т о д и к а

Иммунизации подвергали новорожденных кроликов обоего пола. Для иммунизации взрослых животных с экспериментальным атеросклерозом использовали следующие фракции липопротеидов, выделенные из сыворотки крови: суммарная фракция β -ЛП и пре- β -ЛП, выделенная преципитационным методом по Бурштейну в модификации А. Н. Климова и соавт. [4]; суммарная фракция липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), выделенная методом препаративного ультрацентрифугирования; фракция ЛПОНП, выделенная методом препаративного ультрацентрифугирования; фракция ЛПНП, также выделенная методом препаративного ультрацентрифугирования.

Перед выделением любой из перечисленных фракций липопротеидов из сыворотки крови предварительно удаляли хиломикроны и хиломикроноподобные частицы. С этой целью на 4 мл сыворотки осторожно наслаивали 1 мл водного раствора NaCl с плотностью 1,004, содержащего $8 \cdot 10^{-4}$ М ЭДТА, и производили центрифугирование в бакетном роторе SW-65 при 12 000 об/мин и 15°C в течение 10 мин в ультрацентрифуге «Spinco», модели L2-65B. Верхний слой (0,5 мл), содержащий всплывшие хиломикроны и близкие к ним по составу частицы, отбрасывали. Для выделения суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП к сыворотке, освобожденной от хиломикронов и близких к ним частиц, добавляли кристаллический KBr до плотности 1,063 и производили ультрацентрифугирование в угловом роторе 40,3 при 4°C и 40 000 об/мин в течение 20 ч. Всплывший слой липопротеидов отделяли. Путем наслаивания к нему добавляли двойной объем солевого раствора [5] с плотностью 1,063, содержащий $8 \cdot 10^{-4}$ М ЭДТА, и с целью очистки производили повторное центрифугирование при тех же условиях. Всплывший слой липопротеидов отделяли и подвергали диализу против физиологического раствора при 4°C в течение 24 ч.

Для выделения чистых фракций ЛПОНП и ЛПНП на 5 мл сыворотки осторожно наслаивали 2 мл солевого раствора [5] с плотностью 1,006, содержащего $8 \cdot 10^{-4}$ М ЭДТА, и производили ультрацентрифугирование в течение 18 ч при условиях, указанных выше. Всплывшую фракцию ЛПОНП очищали повторным центрифугированием при той же плотности. Выделенные ЛПОНП подвергали диализу против физиологического раствора в течение 24 ч. Для выделения ЛПНП оставшуюся после первого ультрацентрифугирования при плотности 1,006 нижнюю фракцию доводили с помощью KBr до плотности 1,063, производили два последовательных ультрацентрифугирования и диализ выделенных ЛПНП аналогично тому, как указано выше при выделении чистой фракции ЛПОНП или суммарной фракции липопротеидов. В выделенных фракциях липопротеидов определяли белок по методу Лоури с предварительной экстракцией липидов эфиром перед измерением окраски.

Метод иммунизации заключался в том, что новорожденным кроликам (через 6—8 ч после рождения) вводили липопротеиды из расчета 10 мг белка на инъекцию [2]. Липо-

протеиды вводили в объеме 2 мл на кролика с добавлением 1000 ЕД калиевой соли бензилпенициллина. Примерно 1 мл раствора липопротеидов вводили внутривентриально, остальной объем — подкожно в 4—5 точек в области передних и задних лап и спины. На 2-й день после рождения производили вторую, а на 7-й день — третью инъекцию в тех же дозах. На 30-й день после рождения иммунизированные кролики (так же как и контрольные, неиммунизированные) были отсажены от маток и содержались на обычном пищевом рационе в течение 4 мес. Затем животных переводили на атерогенный рацион. С этой целью кроликам вводили ежедневно (за исключением субботних и воскресных дней) через зонд растворенный в подсолнечном масле холестерин (5 мл 10% раствора, т. е. 0,5 г холестерина на животное в день). Продолжительность опыта составляла 16 нед. Ежемесячно в крови животных определяли содержание холестерина по Нейшлосу [6] и суммарной фракции β -ЛП и пре- β -ЛП по А. Н. Климову и соавт. [4]. У отдельных животных определяли содержание аргинина в ЛПОНП с помощью аминокислотного анализатора JLC-6АН фирмы «Jeol» (Япония), а также разделяли аполипопротеины в полиакриламидном геле [7].

Результаты и обсуждение

Определение холестерина в сыворотке крови показало, что в результате введения холестерина у всех кроликов происходило увеличение его содержания в крови. У контрольных (неиммунизированных) и иммунизированных ЛПНП животных развитие гиперхолестеринемии происходило чрезвычайно быстро, и средний уровень холестерина в сыворотке через 4 мес достиг в этих группах 1007 и 1140 мг% соответственно (рис. 1). У животных, иммунизированных суммарной фракцией β -ЛП и пре- β -ЛП, выделенной преципитационным методом, а также суммарной фракцией ЛПОНП и ЛПНП и чистой фракцией ЛПОНП, гиперхолестеринемия развивалась медленнее и средний уровень холестерина к концу 4-го месяца составлял 850, 761 и 725 мг% соответственно. Примерно такая же закономерность наблюдалась при определении содержания в сыворотке крови экспериментальных животных суммарной фракции β -ЛП и пре- β -ЛП. Средний атеросклеротический показатель (площадь поражения аорт) представлен в табл. 1, из которой видно, что наиболее выраженный защитный эффект был получен в результате иммунизации животных ЛПОНП. Кроме того, в аорте кроликов, иммунизированных ЛПОНП, отмечали только образование липидных пятен, т. е. проявление начальных стадий атеросклероза, поэтому показатель $13,3 \pm 4,6\%$ отражает в основном площадь аорты с липидными пятнами, тогда как в контроле и при иммунизации ЛПНП поражения в аорте были представлены главным образом атеросклеротическими бляшками. При иммуноморфологическом исследовании липидных пятен от кроликов, иммунизированных ЛПОНП, накопление β -ЛП и пре- β -ЛП отсутствовало, так же как и выраженное разрастание фиброзной ткани (рис. 2). В паренхиматозных органах и прежде всего в печени не наблюдали жировой дистрофии.

Таким образом, при иммунизации ЛПОНП получен выраженный эффект толерантности к атерогенным липопротеидам, который, как показали предыдущие исследования [1, 2, 8—10], может рассматриваться как результат создания иммунологической толерантности. Иммунизация ЛПНП не

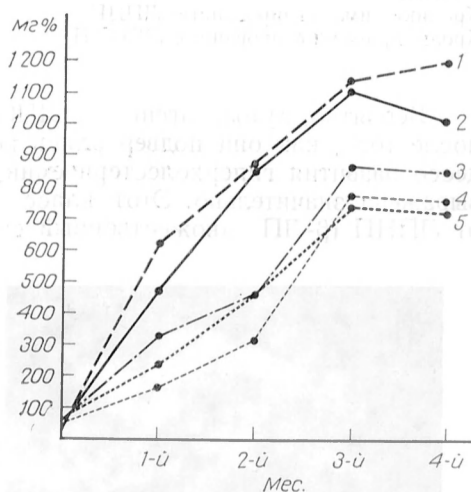


Рис. 1. Среднее содержание холестерина в сыворотке крови у кроликов различных групп при введении им холестерина.

1 — животные, иммунизированные ЛПНП; 2 — контрольные (неиммунизированные) животные; 3 — животные, иммунизированные β -ЛП и пре- β -ЛП; 4 — животные, иммунизированные ЛПОНП+ЛПНП; 5 — животные, иммунизированные ЛПОНП.

дает защитного эффекта, и результаты опыта практически не отличаются от контроля. Надо полагать, что тот защитный эффект, который наблюдался в наших ранних исследованиях при иммунизации суммарной фракцией β -ЛП и пре- β -ЛП, зависел в основном от входящего в ее состав пре- β -ЛП (ЛПОНП).

Т а б л и ц а 1

Площадь поражения аорт атеросклерозом у контрольных кроликов и у кроликов, иммунизированных различными классами липопротеидов после введения им холестерина

Группа животных	Число животных	Средний атеросклеротический показатель, %
Контрольная (неиммунизированные кролики)	7	$82,8 \pm 1,6$
Кролики, иммунизированные суммарной фракцией β -ЛП и пре- β -ЛП, выделенных преципитационным методом	7	$51,5 \pm 10,8$
Кролики, иммунизированные суммарной фракцией ЛПОНП и ЛПНП	5	$41,1 \pm 12,4$
Кролики, иммунизированные ЛПНП	5	$70,9 \pm 8,6$
Кролики, иммунизированные ЛПОНП	5	$13,3 \pm 4,6$

Вероятно, аутоантигенность ЛПОНП (пре- β -ЛП) у кроликов возникает после того, как они подвергались конформационным изменениям в процессе развития гиперхолестеринемии, которая у кроликов в эксперименте выражена значительно. Этот класс липопротеидов, имеющий в отличие от ЛПНП (β -ЛП) множественный состав апопротеинов (у человека их по

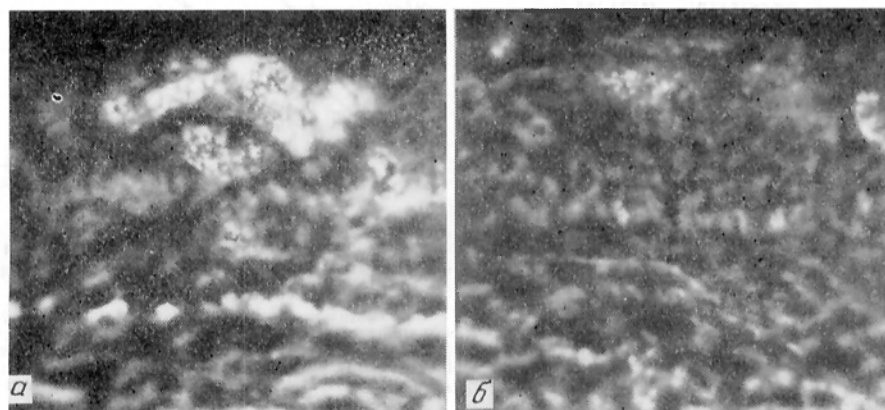


Рис. 2. Липидное пятно аорты кролика.

Специфическое свечение β -ЛП и пре- β -ЛП у кролика, иммунизированного ЛПНП (а), и незначительное свечение у кролика, иммунизированного ЛПОНП (б). Окраска по методу Кунса. Об. $\times 40$, гомаль 1,7.

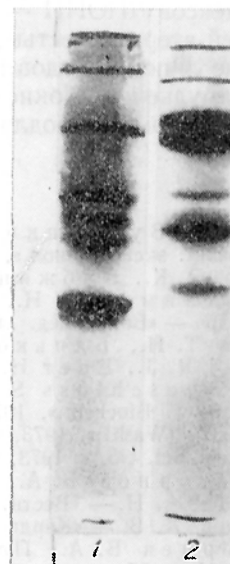
крайней мере 8), подвергается у кроликов заметным изменениям при гиперхолестеринемии: частицы увеличиваются в размере, обогащаются холестерином, в них увеличивается содержание так называемого богатого аргинином апопротеина, обладающего повышенной способностью связывать холестерин [8, 9].

В связи с этим в нашей работе было проведено сравнительное электрофоретическое разделение апопротеинов, входящих в состав ЛПОНП, у кроликов разных групп. Данные, приведенные на рис. 3, показывают апопротеиновый спектр ЛПОНП здорового кролика и кролика с экспериментальным атеросклерозом. Как видно из рис. 3, при развитии экспериментальной гиперхолестеринемии и атеросклероза у кроликов действительно возраста-

ет количество богатого аргинином апопротеина. У животных, иммунизированных чистой фракцией ЛПОНП, полоса этого апопротеина была выражена значительно слабее. Другим подтверждением этого факта является непосредственное определение содержания аргинина в ЛПОНП, проведенное у отдельных кроликов каждой экспериментальной группы (табл. 2). Из дан-

Рис. 3. Электрофоретическое разделение апопротеинов ЛПОНП в полиакриламидном геле.

1 — ЛПОНП, выделенные из плазмы крови здорового кролика; 2 — ЛПОНП, выделенные из плазмы крови кролика с экспериментальной гиперхолестеринемией. В обоих случаях для разделения взято равное количество липопротеидов (100 мкг). В правой трубке сверху видно резкое усиление полос, соответствующих апопротеину С I и богатому аргинином апопротеину, и ослабление самой нижней полосы, соответствующей апопротеину С III.



ных табл. 2 следует, что у кролика, иммунизированного ЛПОНП, отмечается самое низкое содержание аргинина в плазменных ЛПОНП по сравнению с таковым у животных, иммунизированных другими фракциями липопротеидов. Возможно, что высокое содержание богатого аргинином апопротеина в ЛПОНП животных с экспериментальной гиперхолестеринемией

Т а б л и ц а 2

Содержание аргинина в ЛПОНП у кроликов разных групп через 4 мес развития у них гиперхолестеринемии

Животные	Содержание аргинина, мкмоль/мк белка
Здоровый кролик, не получавший холестерина	0,300
Неиммунизированный кролик, получавший холестерин	0,457
Кролик, иммунизированный ЛПОНП и получавший холестерин	0,338
Кролик, иммунизированный суммарной фракцией β -ЛП и пре- β -ЛП и получавший холестерин	0,413
Кролик, иммунизированный суммарной фракцией ЛПОНП и ЛПНП и получавший холестерин	0,442
Кролик, иммунизированный ЛПНП и получавший холестерин	0,449

П р и м е ч а н и е. Анализ содержания аргинина был произведен М. М. Шавловским, за что авторы приносят ему благодарность.

(см. рис. 3, табл. 2) является не только простым отражением степени развития гиперхолестеринемии, но и признаком появившихся у этого класса липопротеидов аутоантигенных свойств.

Исходя из аутоиммунной теории патогенеза атеросклероза [10—13], защитный эффект иммунизации, поворожденных кроликов измененными ЛПОНП, выделенными из сыворотки крови взрослых кроликов с экспериментальной гиперхолестеринемией или атеросклерозом, можно трактовать

следующим образом. Введенные в организм новорожденных кроликов видоизмененные липопротеиды были «приняты» как свои собственные, без выраженного иммунного ответа. В последующем, когда была предпринята попытка вызвать у иммунизированных животных экспериментальный атеросклероз, организм этих животных не вырабатывал антитела на образующиеся ЛПОНП, в результате чего не происходило образование иммунных комплексов ЛПОНП — антитело. Эти комплексы, по-видимому, обладают большей атерогенностью, чем липопротеиды сами по себе. Кроме того, связывание липопротеидов в аутоиммунный комплекс может создать определенные затруднения в окислении липопротеидного холестерина в желчные кислоты и тем самым продлить степень и продолжительность гиперхолестеринемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубжицкий Ю. Н., Нагорнев В. А., Ловягина Т. Н. и др. — «Бюлл. экспер. биол.», 1971, № 2, с. 21. — 2. Баньковская Э. Б., Докусова О. К., Зубжицкий Ю. Н. и др. — «Вестн. АМН СССР», 1972, № 7, с. 78. — 3. Климов А. Н., Петрова-Маслакова Л. Г., Нагорнев В. А. и др. — «Вопр. мед. химии», 1975, № 5, с. 526. — 4. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Баньковская Э. Б. — «Лаб. дело», 1966, № 5, с. 276. — 5. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. — «J. clin. Invest.», 1955, v. 34, p. 1345. — 6. Neuschloss S. M. — «Biochem. Z.», 1930, Bd 225, S. 115. — 7. Кане J. P. — «Analyt. Biochem.», 1973, v. 53, p. 350. — 8. Shore V. G., Shore B. — «Biochemistry (Wash.)», 1973, v. 12, p. 502. — 9. Havel R. J., Кане J. P. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1973, v. 70, p. 2015. — 10. Иоффе В. И., Зубжицкий Ю. Н., Нагорнев В. А. и др. — «Бюлл. экспер. биол.», 1973, № 6, с. 72. — 11. Климов А. Н. — «Вести. АМН СССР», 1974, № 2, с. 29. — 12. Климов А. Н., Попов А. В. — «Кардиология», 1976, № 2, с. 30. — 13. Зубжицкий Ю. Н., Нагорнев В. А., Петрова-Маслакова Л. Г. — «Вестн. АМН СССР», 1974, № 11, с. 57.

Поступила 28/II 1977 г.

ON THE NATURE OF LIPOPROTEIN ANTIGEN, RESPONSIBLE FOR DEVELOPMENT OF STABILITY TO EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS AFTER IMMUNIZATION OF NEWBORN RABBITS

*A. N. Klimov, T. N. Lovyagina, V. A. Nagornev, Yu. N. Zubzhitsky,
L. G. Petrova-Maslakova, E. B. Ban'kovskaya, E. Ya. Magracheva, I. A. Oleynik*

N. N. Anichkov Department of Atherosclerosis, Department of Microbiology and Immunology -
Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

In order to develop a tolerance to experimental atherosclerosis newborn rabbits were immunized with various fractions of atherogenic lipoproteins (lipoproteins of low density, lipoproteins of very low density and total fraction of these lipoproteins), isolated from blood serum of adult rabbits with experimental hypercholesterolemia. The tolerance to atherosclerosis proved to be achieved in immunization with lipoproteins of very low density. The lesser effect was observed using the total fraction of lipoproteins. The tolerance was not developed in immunization with lipoproteins of low density.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.155.2-008.931:577.152.143-074:543.42

И. В. Вережкина, И. И. Курилова

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ В ТРОМБОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Институт психиатрии
АМН СССР, Москва

Описан метод определения активности моноаминоксидазы (МАО) в тромбоцитах человека, основанный на сочетании моноаминоксидазной и алкогольдегидрогеназной реакций. Метод обладает высокой воспроизводимостью и позволяет работать с небольшими объемами крови. Полученные этим методом значения активности МАО совпадают с данными литературы.

За последние годы появились работы по изучению активности моноаминоксидазы (МАО; КФ 1.4.3.4) в тромбоцитах человека при различных заболеваниях: гипертонической болезни [1], при заболеваниях центральной нервной системы [2—6].

Снижение активности МАО в тромбоцитах рассматривают как важный показатель предрасположения к таким заболеваниям, как шизофрения или маниакально-депрессивные психозы [7].

Для определения активности МАО в тромбоцитах обычно применяют радиометрические методы [2—5]; эти методы высокочувствительны и специфичны, однако требуют применения меченых субстратов. Флюориметрический метод определения активности МАО, основанный на измерении количества образующейся при окислении серотонина 5-оксииндолуксусной кислоты [8], не может быть рекомендован для измерения активности МАО тромбоцитов в условиях клиники потому, что скорость дезаминирования серотонина МАО тромбоцитов очень низка и в норме [9]; при патологических состояниях, когда можно ожидать снижения активности МАО, данный метод не позволит получать надежные количественные данные. Использование при работе с тромбоцитами в клинике рутинных методов определения МАО [10] затруднено в связи с их невысокой чувствительностью и с невозможностью получения большого количества тромбоцитной массы от одного человека.

Задача настоящей работы заключалась в разработке простого, пригодного для использования в клинике и при массовых обследованиях населения метода измерения активности МАО тромбоцитов человека.

В предыдущих исследованиях для определения активности митохондриальной МАО печени с использованием различных субстратов оказался удобен метод, основанный на сочетании моноаминоксидазной и алкогольдегидрогеназной реакции [11]. Метод основан на свойстве алкогольдегидрогеназы (АДГ; КФ 1.1.1.1) из тканей млекопитающих катализировать восстановление до соответствующих спиртов в присутствии избытка НАД-Н₂ жирно-ароматических альдегидов, образующихся при ферментативном дезаминировании аминов.

В настоящей работе описана модификация метода определения активности МАО в тромбоцитах человека с использованием в качестве субстрата бензиламина. Данная модификация метода не предназначена для исследования кинетики катализируемых МАО реакций.

Методы

Использовали АДГ из печени лошади (кристаллическая суспензия) и НАД-Н₂ фирмы «Reanal» (Венгрия), тритон X-100 фирмы T. Schuchardt (ФРГ). Бензиламин гидрохлорид (х. ч.) отечественного производства был дважды перекристаллизован из смеси ацетон — вода (10 : 1).

Кровь у людей брали из локтевой вены в пластиковую или стеклянную силиконизированную посуду. На каждые 10 мл крови добавляли 1 мл раствора Рингера, содержащего 200 МЕ гепарина. Кровь центрифугировали 15 мин при 225 g для получения обогащенной тромбоцитами плазмы, которую центрифугировали еще 20 мин при 750 g для осаждения тромбоцитов [12]. Осадок тромбоцитов трижды промывали 0,14 М NaCl для удаления белков крови и при невозможности немедленного использования хранили (не более месяца) при —20°C. Все процедуры проводили при 4°C.

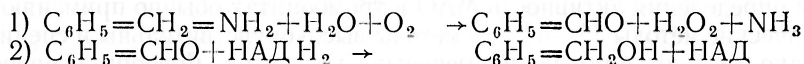
Для исследования тромбоциты размораживали и гомогенизировали в таком объеме 0,2 М К—Na-фосфатного буфера pH 7,4, чтобы содержание белка составляло 5—10 мг/мл. Содержание белка определяли по методу Лоури [13]; средний выход тромбоцитного белка составлял примерно 1 мг из 3—5 мл крови. Для солиubilизации тромбоцитов к их суспензии в буфере добавляли 25% раствор тритона X-100 до конечной концентрации 1%.

Результаты и обсуждение

По современным представлениям, в различных тканях человека и животных [14, 15] содержится по крайней мере два типа MAO: А и Б, которые различаются по субстратной и ингибиторной специфичности. Так, MAO типа А окисляет преимущественно серотонин или норадреналин, тогда как для MAO типа Б специфическими субстратами являются бензиламин или β-феилэтиламин. Установлено, что в тромбоцитах человека имеется MAO только типа Б [8, 16], поэтому в качестве субстрата для измерения активности MAO мы использовали бензиламин.

Принцип метода

Предлагаемая методика для определения активности MAO в тромбоцитах основана на следующей последовательности ферментативных реакций:



Реакцию 1 (окислительное дезаминирование бензиламина) катализирует MAO тромбоцитов; реакцию 2 (восстановление бензальдегида) — АДГ из печени лошади.

При определенных условиях концентрация бензальдегида, образовавшегося при дезаминировании бензиламина, эквивалентна концентрации ферментативно окисленного НАД-Н₂ (реакция 2). Измеряя спектрофотометрически убыль НАД-Н₂ по уменьшению оптической плотности при 340 нм, можно судить об активности MAO.

Состав проб и условия определений

Опытные пробы (общий конечный объем 2,5 мл) содержали 0,1 М фосфатный буфер pH 7,4 от 2 до 4 мг белка солиubilизированной суспензии тромбоцитов, 200 мкг АДГ, 0,32 мг НАД-Н₂ ($2 \cdot 10^{-4}$ М) и 1,5 мг бензиламина ($4,2 \cdot 10^{-3}$ М). Контрольные пробы бензиламина не содержали. Пробы преинкубировали при 37°C в течение 30 мин, после чего в обеих пробах измеряли величину оптической плотности при 340 нм. Затем инкубацию продолжали еще 60 мин при 37°C и повторно измеряли оптическую плотность при 340 нм. Во всех случаях реакцию начинали добавлением бензиламина и останавливали — помещением проб в ледяную баню. Об активности MAO в опытной пробе судили по разности снижения оптической плотности опытной и контрольной проб. Принимая коэффициент молярной экстинкции НАД-Н₂ при 340 нм равным $6,22 \cdot 10^3$ [11], активность MAO выражали в наномолях окисленного НАД-Н₂ на 1 мг белка тромбоцитов за 60 мин инкубации, в течение которых реакция протекает согласно уравнению нулевого порядка.

Факторы, изученные при подборе условий определений

В предварительных опытах было установлено, что после добавления НАД-Н₂ в пробы, содержащие солиобилизованную суспензию тромбоцитов человека, АДГ и 0,1 М фосфатный буфер pH 7,4, не содержавшие бензиламина, имело место постепенное снижение оптической плотности при

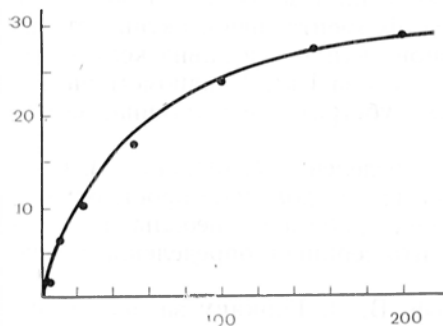


Рис. 1. Зависимость активности МАО в солиобилизованной суспензии тромбоцитов от содержания АДГ в пробах.

Пробы объемом 2,5 мл содержали в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) 0,32 мг НАД-Н₂, 1,5 мг бензиламина, 3 мг белка тромбоцитов и различные количества АДГ. По оси абсцисс — содержание АДГ в пробе (в мкг), по оси ординат — активность МАО (в ммоль/мг за 60 мин).

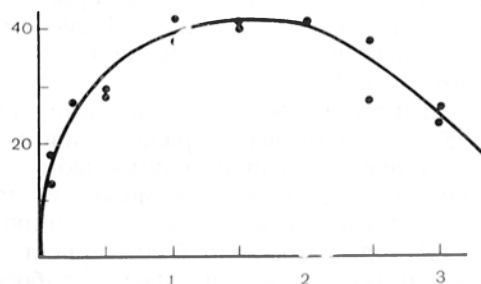


Рис. 2. Зависимость активности МАО в солиобилизованной суспензии тромбоцитов от содержания в пробах бензиламина.

Состав проб (конечный объем 2,5 мл): 3 мг белка, 200 мкг АДГ, 0,32 мг НАД-Н₂, 0,1 М фосфатный буфер pH 7,4 и различные количества бензиламина. По оси абсцисс — содержание бензиламина в пробе (в мг); по оси ординат — активность МАО (в ммоль/мг за 60 мин).

340 нм в ходе инкубирования таких проб при 37°C. Указанное снижение оптической плотности проб не предотвращалось ингибитором МАО паргилином и было обусловлено, по-видимому, разрушением части добавляемого в пробы избытка НАД-Н₂, присутствующей в тромбоцитах человека НАД-Н-оксидазой. Не изучая природу этого процесса, мы установили, что он заканчивался в условиях наших опытов за 20—30 мин при 37°C, поэтому во всех опытах пробы преинкубировали в течение 60 мин при 37°C.

При содержании в пробах объемом 2,5 мл 150 мкг АДГ активность МАО суспензии тромбоцитов измеряется практически полностью (рис. 1); дальнейшее увеличение содержания АДГ в пробах не приводит к обнаружению более высокой активности МАО.

Рекомендуемая концентрация бензиламина является оптимальной (рис. 2). При подобранных экспериментальных условиях отмечена линейная зависимость между количеством внесенных в пробу тромбоцитов (в интервале от 1 до 5 мг белка на пробу) и измеряемой активностью МАО (рис. 3).

Для оценки воспроизводимости получаемых данным методом результатов с учетом всех процедур, включая выделение тромбоцитов, от одного и того же донора были взяты 4 порции крови по 30 мл; из каждой порции были выделены тромбоциты и определена в них активность МАО. Получены

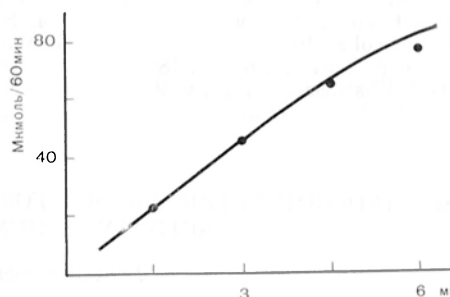


Рис. 3. Зависимость активности МАО в солиобилизованной суспензии тромбоцитов от количества белка тромбоцитов в пробах.

Пробы объемом 2,5 мл содержали 200 мкг АДГ, 0,32 мг НАД-Н₂, 1,5 мг бензиламина, 0,1 М фосфатный буфер pH 7,4 и различные количества белка. По оси абсцисс — количество белка в пробе (в мг); по оси ординат — количество (в ммоль) окисленного за 60 мин НАД-Н₂. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-4А.

следующие значения: 42,7, 43,9, 42,0, 41,1 (нмоль за 60 мин). Средняя величина активности МАО составила $42,4 \pm 0,68$ нмоль/мг; значение критерия достоверности (по Стьюденту) равно 62,3.

Средняя активность МАО тромбоцитов здоровых людей, определенная в этих условиях, составляла около 40 нмоль НАД-Н₂ на 1 мг белка за 60 мин. Эта величина активности МАО для тромбоцитов сопоставима с таковой, определенной Нисом и соавт. [17] (32—36 нмоль на 1 мг белка за 60 мин) и Коллинзом и Сандлером [16] ($0,95 \pm 0,1$ ед. ферментативной активности на 1 мг белка за 1 мин; единица ферментативной активности равна количеству фермента, дезаминирующему 1 нмоль субстрата за 1 мин) радиометрическими методами с использованием в качестве субстрата бензиламина, меченого по С¹⁴.

Таким образом, предлагаемый метод определения активности МАО не требует использования радиоактивных субстратов, довольно прост, отличается высокой воспроизводимостью и позволяет работать с небольшими объемами крови, что дает возможность наладить серийное определение активности фермента в условиях клиники.

Авторы выражают благодарность проф. В. З. Горкину за ценные советы и постоянный интерес к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anselmi B., Buffoni F., Curradi C. et al. — «Agents a. Actions», 1975, v. 5, p. 489. — 2. Sandler M., Youdim M. B., Hanington E. — «Nature», 1974, v. 250, p. 335. — 3. Murphy D. L., Weiss R. — «Am. J. Psychiat.», 1972, v. 128, p. 1351. — 4. Wyatt R. J., Murphy D. L., Belmaker R. et al. — «Science», 1973, v. 179, p. 916. — 5. Murphy D. L., Wyatt R. J. — «Nature», 1971, v. 238, p. 225. — 6. Zeller E. A., Boshes B., Davis J. M. et al. — «Lancet», 1975, v. 1, p. 1385. — 7. Buchsbaum M., Coursey R. D., Murphy D. L. — «Science», 1976, v. 194, p. 339. — 8. Takahashi S., Karasawa T. — «Clin. chim. Acta», 1975, v. 62, p. 393. — 9. Murphy D., Dounely L. — «Advanc. Biochem. Psychopharmacol.», 1974, v. 12, p. 71. — 10. Исаханян Г. Д., Акопьян Ж. И., Горкин В. З. — «Лабор. дело», 1973, № 10, с. 589. — 11. Вереvкина И. В., Якушева М. И. — «Вопр. мед. химии», 1977, т. 23, с. 375. — 12. Murphy D. L., Colburn R. W., Davis J. M. — «Life Sci.», 1969, v. 8, p. 1187. — 13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 14. Squires R. F. — «Advanc. biochem. Psychopharmacol.», 1973, v. 5, p. 355. — 15. Yang H.-Y. T., Neff N. H. — «J. Pharmacol. exp. Ther.», 1974, v. 189, p. 733. — 16. Collins G. G., Sandler M. — «Biochem. Pharmacol.», 1971, v. 20, p. 289. — 17. Nies A. M., Robinson D. S., Lam-born K. R. et al. — «Arch. gen. Psychiat.», 1973, v. 28, p. 834.

Поступила 13/1 1977 г.

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR ESTIMATION OF MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN HUMAN THROMBOCYTES

I. V. Veryovkina, I. I. Kurilova

Institute of Biological and Medical Chemistry, Institute of Psychiatry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A method for estimation of monoamine oxidase activity in human thrombocytes is developed. The method is based on coupling of monoamine oxidase and alcohol dehydrogenase reactions. The method was highly reproducible. Small volumes of blood were required for analysis. Values of MAO activity, obtained by the method, were in good agreement with the data published in literature.

РЕЦЕНЗИИ

УДК 616-074:577.1(049.3)

Ф. И. Комаров, Б. Ф. Коровкин, В. В. Меньшиков. *Биохимические исследования в клинике*. М., «Медицина», 1976.

В последнее десятилетие значительно возросло число биохимических методов в клинко-лабораторных исследованиях. Это связано с высокой информационной ценностью комплексов современных биохимических показателей. Соответствующая отечественная литература в этой области в значительной мере устарела, однако книга Ф. И. Комарова, Б. Ф. Коровкина и В. В. Меньшикова занимает особое место не только из-за своей новизны. Авторы смогли сочетать три подхода: 1) оценку диагностического значения биохимических показателей, взятых в отдельности; 2) установление диагностической роли и значимости (в том числе самостоятельной роли) комплексов, спектров биохимических данных; 3) особенно детальное обсуждение биохимических показателей при некоторых заболеваниях, по которым авторы имеют большой собственный опыт. Они вполне обоснованно и критически подошли к отбору лишь наиболее информативных и надежных методов. Описание и обсуждению их диагностической и прогностической ценности посвящены первые 9 глав. Для рецензируемой книги характерной особенностью является направленность на комплексное использование биохимических показателей. Глава 10 посвящена именно так называемым биохимическим конstellляциям. В результате этого читатель оказывается логически подготовленным к особенно современному разделу (глава 11), где рассматриваются пути и конкретные возможности автоматизации комплексных клинко-биохимических исследований. Высокопроизводительные и надежные автоматы для получения комплексов биохимических показателей при малых объемах исследуемых проб — один из наиболее перспективных путей развития клинической биохимии, и авторы справедливо делают на этом акцент.

Достоинством книги является и то обстоятельство, что авторы опираются на большой собственный опыт и лично апробировали большинство описываемых методов. Более того, в книге есть целые разделы, основанные на оригинальных всесторонних исследованиях авторов. К ним в первую очередь относится глава, где рассматриваются связи между изотимными спектрами различных ферментов и некоторыми патологическими процессами (глава 1, с. 30).

Высоко оценивая пользу и оригинальность руководства, отметим лишь один дискуссионный элемент в построении книги. В главе 1 (до с. 23) излагается ряд общих положений белковой химии и энзимологии. С одной стороны, для сотрудников, не имеющих хорошей биохимической подготовки, но вынужденных заниматься клинической биохимией, это ценно, тем более что раздел этот изложен вполне квалифицированно. С другой стороны, не следует слишком далеко заходить в нарушении «разделения труда» между учебником биохимии типа книги Б. И. Забарского, С. Р. Мардашева и И. И. Иванова и данным руководством. В ближайшие годы опыт использования рецензируемого руководства покажет, нужен ли действительно этот общий вводный отдел. Все сказанное не распространяется на более узко специализированные вводные главы к ряду разделов; их необходимость очевидна и не зависит в такой мере от уровня подготовки читателя.

В целом книгу Ф. И. Комарова, Б. Ф. Коровкина и В. В. Меньшикова следует считать наиболее современным отечественным руководством по проблеме, оригинальным по подходу и материалам. После того как будет накоплен опыт ее использования, целесообразно расширение и переиздание книги. Необходимо отметить также хорошее качество редактирования и оформления руководства.

И. А. Ашмарин

СОДЕРЖАНИЕ

- Содиков Э. С., Казаков К. С. Некоторые новые аспекты действия изониазида на активность трансаминаз при туберкулезе 3
- Ларионов Н. П. О состоянии гликолитической системы в гипертрофированном сердце 7
- Фролькис В. В., Безруков В. В., Мурадян Х. К. Синтез фракций РНК печени крыс при однократном и многократном раздражении гипоталамуса 12
- Горюхина О. А., Ткаченко А. А. Выделение катионных белков из тромбоцитов крови кроликов и изучение их бактериостатической активности 17
- Сковронская Е. В. Метаболизм печени при массивной кровопотере и ее возмещении 22
- Егорова В. А., Беляева З. Н., Блинов М. Н. Активность аденилциклазы кровяных пластинок человека при некоторых заболеваниях системы крови 28
- Хватова Е. М., Лавровский С. Н. Изоферменты лактатдегидрогеназы мозга в разных условиях кислородного голодания 31
- Кашкин К. П., Никифорова Н. А. Активность некоторых изоферментов сердечной мышцы, почек и сыворотки крови при экспериментальной стафилококковой инфекции 35
- Кричевская А. А., Шугалей В. С., Цветненко Е. З., Ананян А. А. Защитное действие аргинина при гипероксии. Активность глутаминазы и глутаматдекарбоксилазы мозга 42
- Кайкова В. М. О содержании основных липидных фракций в миокарде различных отделов сердца здоровых людей 46
- Клюева Н. Н. Влияние стероидных гормонов на активность глутаматдегидрогеназы митохондрий печени крыс 49
- Кузьмак Н. И. Влияние тиреостатических препаратов и тиреоидэктомии на содержание сиаловых кислот в сыворотке крови и печени у крыс 52
- Житнухин Ю. Л., Плесков В. М. Выделение и анализ энцефалитогенных фракций белков спинного мозга 57
- Огнева В. К., Репин В. С., Чернявский В. А. Характеристика белкового состава и синтез белка в изолированных островках

CONTENTS

- Sodikov, E. S., Kazakov, K. S.: Some New Aspects of Isoiazid Effect on Transaminases Activity in Tuberculosis 3
- Larionov, N. P.: On the State of Glycolytic System in Hypertrophic Heart 7
- Frol'kis, V. V., Bezrukov, V. V., Muradyan, Kh. K.: Synthesis of RNA Fractions in Rat Liver Tissue in Single and Repeated Stimulation of Hypothalamus 12
- Goryukhina, O. A., Tkachenko, A. A.: Isolation of Cation-Containing Proteins from Thrombocytes of Rabbit Blood and Their Bacteriostatic Activity 17
- Skovronskaya, E. V.: Metabolism in Liver Tissue Under Conditions of Profuse Hemorrhage and in Its Compensation 22
- Egorova, V. A., Belyaeva, Z. N., Blinova, M. N.: Activity of Adenyl Cyclase from Platelets in Some Blood Systemic Impairments 28
- Khvatova, E. M., Lavrovsky, S. N.: Lactate Dehydrogenase Isozymes from Brain in Various Conditions of Oxygen Deficiency 31
- Kashkin, K. P., Nikiforova, N. A.: Activity of Some Isoenzymes from Heart, Kidney and Blood Serum in Experimental Staphylococcal Infection 35
- Krichevskaya, A. A., Shugaley, V. S., Tsvetnenko, E. Z., Ananyan, A. A.: The Protective Effect of Arginine in Hyperoxia. Activity of Glutaminase and Glutamate Decarboxylase in brain 42
- Kaykova, V. M.: On the Content of Main Lipid Fractions in Various Parts of Myocardium of Healthy People 46
- Klyueva, N. N.: Effect of Steroid Hormones on Glutamate Dehydrogenase Activity in Rat Liver Mitochondria 49
- Kuz'mak, N. I.: Effect of Thyrostatic Preparations and Thyroidectomy on Content of Sialic Acids in Rat Blood Serum and Liver Tissue 52
- Zhitnukhin, Yu. L., Pleskov, V. M.: Isolation and Study of Encephalitogenic Protein Fractions from Medulla Spinalis 57
- Ogneva, V. K., Repin, V. S., Chernyavsky, V. A.: Characteristics of Protein Composition and of Its Synthesis in Isolated Pancreatic

- Лангерганса поджелудочной железы крыс в норме и при аллоксановом диабете
- Кириллук А. Г., Хмелевский Ю. В. Механизмы взаимодействия витаминов В₁ и РР при всасывании в кишечнике крыс
- Карагезян К. Г., Овсепян Л. М., Дадаян М. А., Адонтз К. Г. Изучение перекисного окисления и антиокислительной активности липидов при экспериментальном панкреатите
- Федуров В. В. Активация включения меченых предшественников в убихинон в срезах гипертрофированной почки крысы
- Бронштейн Л. М., Анисимов А. А., Облизина Г. В., Дубовская С. С., Рабинович И. Ш. Влияние обеспеченности организма витамином К на электрофоретическую характеристику белков эритроцитарных мембран
- Пушкарская Н. Л., Дикий В. В., Галегов Г. А. Влияние 1-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамидов на синтез клеточных макромолекул в культуре клеток
- Никифорова А. А., Чистякова А. М., Матвеев И. И., Терюкова Н. П., Архипов О. П., Клиорин А. И., Климов А. Н. Сравнительная недостаточность лецитин-холестерин-ацетилтрансферазы в крови новорожденных. Сопоставление эстерифицирующей активности плазмы крови новорожденного и матери-роженицы
- Делекторская Л. Н. О выборе оптимальных условий измерения активности аспартат-аминотрансферазы
- Базанов Е. А., Воробьев Л. П., Бренер Е. Д., Подольская О. В., Сучков В. В., Герасимова Е. Н., Лебедева Л. Н., Ткаченко К. Н. Особенности обмена коллагена сосудистой стенки при изменениях центрально-вегетативной регуляции
- Швецкий А. Г., Воробьева Л. М. О влиянии неспецифических биогенных стимуляторов пентоксила и мумие на некоторые обменные процессы
- Попов А. В., Виноградов А. Г., Надточий В. В. Электронно-автордиографическое и биохимическое изучение роли пенных клеток в метаболизме липопротеидов низкой плотности
- Кобляков В. А., Коляда А. Ю. Изучение состояния ферментной системы микросомальных оксигеназ при хроническом введении 2-ацетиламинофлуорена
- Langerhans' Islands of Rats in Normal State and with Alloxan Diabetes
- Kirilyuk, A. G., Khmelevsky, Yu. V.: Interaction Between Vitamins B₁ and PP on Absorption in Rat Intestine
- Karagezyan, K. G., Ovsepyan, L. M., Dadayan, M. A., Adontz, K. G.: Peroxidative and Antioxidative Activities of Lipids in Experimental Pancreatitis
- Fedurov, V. V.: Activation of Labelled Precursors Incorporation into Ubiquinone in Slices of Rat Hypertrophic Kidney
- Bronstein, L. M., Anisimov, A. A., Oblizina, G. V., Dubovskaya, S. S., Rabinovich, I. Sh.: Effect of Vitamin K on the Electrophoretic Mobility of Proteins from Erythrocyte Membranes
- Pushkarskaya, N. L., Dikiy, V. V., Galegov, G. A.: Effect of 1-D-Ribofuranosyl-1, 2, 4-Triazol-3-Carboxamide on the Synthesis of Cellular Macromolecules in Cell Culture
- Nikiforova, A. A., Chistyakova, A. M., Matveev, I. I., Teryukova, N. P., Arkhipov, O. P., Kliorin, A. I., Klimov, A. N.: Relative Insufficiency in the Lecithin-Cholesterol-Acetyl Transferase Activity in Blood of Newborn Children. Correlation Between the Esterification Activity in Blood Plasma of Newborns and of Their Mothers
- Delektorskaya, L. N.: On the Choose of Optimal Conditions for Estimation of Aspartate Aminotransferase Activity
- Bazanov, E. A., Vorob'eva, L. P., Brenner, E. D., Podol'skaya, O. V., Suchkov, V. V., Gerasimova, E. N., Lebedeva, L. N., Tkachenko, K. N.: Characteristics of Collagen Metabolism in Vessel Wall under Altered Central-Vegetative Regulation
- Shvetsky, A. G., Vorob'eva, L. M.: On the Effect of Unspecific Biogenic Stimulants Pentoxyl and Mummie on Some Metabolic Processes
- Popov, A. V., Vinogradov, A. G., Nadtochy, V. V.: Function of foam Cells in Metabolism of Low Density Lipoproteins
- Koblyakov, V. A., Kolyada, A. Yu.: The State of Enzymatic System of Microsomal Oxygenases in Repeated Administration of 2-acetyl Aminofluorene

- Никифорова А. А., Чистякова А. М., Матвеев И. И., Терюкова Н. П., Ливчак М. Я., Маграчева Е. Я., Климов А. Н. Химический состав липопротеидов высокой и низкой плотности плазмы крови новорожденных 118
- Белобрагина Г. В., Медведев Л. А. Изменение содержания ряда компонентов соединительной ткани легких крыс в процессе старения 123
- Рудник В. С. Фосфофруктокиназная активность чумного микроба 127
- Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Нагорнев В. А., Зубжицкий Ю. Н., Петрова-Маслакова Л. Г., Баньковская Э. Б., Маграчева Е. Я., Олейник И. А. О природе липопротеидного антигена, ответственного за развитие устойчивости к экспериментальному атеросклерозу после иммунизации им новорожденных кроликов 131

Методы биохимических исследований

- Веревкина И. В., Курилова И. И. Спектрофотометрический метод определения активности моноаминоксидазы в тромбоцитах человека 137

Рецензия

- Ашмарин И. А. Рецензия на книгу Ф. И. Комарова, Б. Ф. Коровкина, В. В. Меньшикова. Биохимические исследования в клинике. М., «Медицина», 1976 141

- Nikiforova, A. A., Chistyakova, A. M., Matveeva, I. I., Teryukova N. P., Livchak, M. Ya., Magracheva, E. Ya., Klimov, A. N.: Chemical Composition of High and Low Density Lipoproteins in Blood Plasma of Newborn Children 118
- Belobragina, G. V., Medvedev, L. A.: Dynamics of Alterations in Rat Lung Connective Tissue During Postnatal Ontogenesis 123
- Rudnik, V. S.: The Phosphofructokinase Activity in Pestilential Microbe 127
- Klimov, A. N., Lovyagina, T. N., Nagornev, V. A., Zubzhitsky, Yu. N., Petrova-Maslakova, L. G., Ban'kovskaya, E. B., Magracheva, E. Ya., Oley-nik, I. A.: On the Nature of Lipoprotein Antigen, Responsible for Development of Stability to Experimental Atherosclerosis after Immunization of Newborn Rabbits 131

Methods of Bioschemical Investigations

- Veryovkina, I. V., Kurilova, I. I.: Spectrophotometric method for estimation of Monoamine Oxidase Activity in Human Thrombocytes 137

Book Reviews

- Ashmarin, I. A.: F. I. Komarov, B. F. Korovkin, V. V. Menshikov. Biochemical Investigations in a Clinic 141

Техн. редактор Трофимова Г. В.

Корректор Юрчук В. С.

Сдано в набор 17/XI 1977 г. Подписано к печати 9/I 1978 г. Формат бумаги 70X108/16
печ. л. 9,00 +0,13 печ. л. вкл. (условных 12,78 л.) уч.-изд. л. 12,77 Тираж 2085 экз. Заказ 2789

Издательство «Медицина». Москва, Петровверигский пер., 6/8.
Чеховский полиграфический комбинат Союзполиграфпрома
при Государственном комитете Совета Министров СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области