

М. Н. Калинин, Д. И. Бельченко

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АТЕРОГЕННЫХ ФРАКЦИЙ ЛИПОПРОТЕИДОВ НА ЛИПИДОГРАММУ КРОВИ И МИОКАРДА КРОЛИКОВ

Кафедра патологической физиологии Калининского медицинского института

Длительное (1,5—2 мес) внутривенное введение кроликам гомологичной суммарной фракции пре-β- и β-липопротеидов, выделенной из крови интактных животных, вызывает значительные изменения липидограммы сыворотки крови кроликов-реципиентов, проявляющиеся в повышении концентрации всех компонентов липидного спектра плазмы, увеличении содержания в крови пре-β-липопротеидов и β-липопротеидов и уменьшении содержания α-липопротеидов. Эти изменения могут быть связаны не только с избыточным введением атерогенных липопротеидов, но и с нарушениями липидного обмена, обусловленными воспроизведенной у подопытных животных гиперлиппротеидемией.

Длительное внутривенное введение гомологичных атерогенных липопротеидов (АЛП) кроликам впервые осуществлено А. Н. Климовым и соавт. [2, 3], которым удалось получить у животных-реципиентов атероматозные изменения сосудов и тем самым доказать атерогенность пре-β- и β-ЛП. Детальное изучение влияния введения АЛП на особенности липидного обмена в этих исследованиях не проводилось. Между тем подобное исследование может пролить свет на некоторые биохимические механизмы экспериментального атерогенеза.

Целью настоящей работы было изучение липидограммы крови и миокарда кроликов, подвергавшихся длительному парентеральному введению суммарной фракции пре-β- и β-ЛП.

М е т о д и к а

Исследования проведены на 41 кролике породы шиншилла весом 2—3,5 кг. 26 опытным животным внутривенно вводили АЛП, 15 интактных кроликов использовали для контрольных исследований.

Суммарную фракцию пре-β- и β-ЛП, выделенную из сыворотки крови интактных кроликов-доноров описанным методом [4], растворяли в физиологическом растворе NaCl и вводили кроликам-реципиентам в течение 1,5—2 мес по 2—3 раза в неделю.

До введения АЛП и после завершения эксперимента определяли содержание в сыворотке крови опытных животных суммарной фракции пре-β- и β-ЛП [11], фосфолипидов, свободного и эстерифицированного холестерина, свободных жирных кислот, триглицеридов и липопротеидограмму. Кроме того, определяли сырой вес α-ЛП, выделенных из 2 мл сыворотки [12]. Следует отметить, что определение сырого веса α-ЛП не отражает их истинное содержание в крови животных, поскольку выделяемая этим методом фракция α-ЛП содержит примесь других сывороточных белков. Однако с учетом того, что выделение α-ЛП из равных количеств сыворотки крови кроликов проводилось до и после введения АЛП одним и тем же методом, представлялось возможным сравнить содержание этого класса липопротеидов в крови животных до начала эксперимента и по его завершении. Спектр липопротеидов крови исследовали электрофорезом в полиакриламидном геле [13] с последующей деисотметрией электрофореграмм. Для определения концентрации индивидуальных липидных фракций из 0,25 мл сыворотки крови получали экстракт общих липидов и отмывали его от нелипидных примесей [14]. Фракционирование общих липидов проводили методом проточной горизонтальной тонкослойной хроматографии [9] в системе н-гексан — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота (75 : 15 : 1,25) с использованием в качестве сорбента силикагеля марки КСК. Содержание липидных фракций определяли спектрофотометрически на СФ-16 [16]. Таким же образом определяли количество свободного и эстерифицированного холестерина в суммарной фракции пре-β- и β-ЛП, выделенной

Т а б л и ц а 1

Изменение липидо- и липопротеидограммы сыворотки крови кроликов после длительного введения атерогенных фракций липопротеидов

Время исследования	Сумма фракций пре-β и β-ЛП	Фосфолипиды	Свободные жирные кислоты	Триглицериды	Свободный холестерин	Эфиры холестерина	Общий холестерин	% от общего количества липопротеинов			Сырой вес α-ЛП, выделенных из 2 мл сыворотки крови
								Пре-β-ЛП	β-ЛП	α-ЛП	
мг/ 100 мл											
До введения АЛП (n=26)	181 ± 15,8	104 ± 8,18	24,2 ± 4,60	59,1 ± 8,43	18,1 ± 2,02	49,5 ± 5,01	67,6 ± 6,07	22,3 ± 2,07	28,8 ± 3,15	48,9 ± 4,06	97,2 ± 13,4 (n=14)
	574 ± 72,5***	174 ± 22,5**	53,5 ± 9,8*	178 ± 28,1***	43,8 ± 5,15***	110 ± 12,5***	154 ± 15,2***	38,9 ± 4,32***	40,2 ± 4,52*	20,9 ± 3,96***	46,5 ± 9,02** (n=19)

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочками отмечены данные, достоверно отличающиеся от исходных значений: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

из сыворотки крови кроликов-доноров. Зная эти величины, можно было рассчитать количество общего холестерина, вводимого с АЛП. Перед выделением суммарной фракции липопротеидов определяли их концентрацию в сыворотке крови кроликов-доноров. Зная их содержание и объем использованной сыворотки, рассчитывали количество введенных липопротеидов.

После декапитации подопытных и контрольных животных иссекали пробы миокарда левого и правого желудочков, левого и правого предсердий и межжелудочковой перегородки сердца кроликов, отмывали их от крови ледяным физиологическим раствором NaCl и взвешивали на аналитических весах. Одну навеску исследуемого отдела миокарда гомогенизировали на льду в смеси из 2 частей хлороформа и 1 части метанола, получали отмытый от нелипидных примесей экстракт общих липидов и определяли концентрацию свободного и эстерифицированного холестерина по описанному выше методу. Вторую навеску гомогенизировали в физиологическом растворе NaCl и в полученном гомогенате определяли содержание белка [15]. Концентрацию липидных фракций в миокарде выражали в миллиграммах на 1 г тканевого белка.

Результаты исследований обрабатывали статистически [8].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования липидограммы сыворотки крови опытных кроликов представлены в табл. 1. До введения суммарной фракции пре-β- и β-ЛП липидограмма крови животных значительно не отличалась от приводимой в литературе [5, 10]. Длительное введение АЛП обуславливало статистически достоверное увеличение концентрации всех компонентов липидного спектра плазмы крови (P от 0,012 до $<0,001$). Одновременно наблюдалось изменение липопротеидограммы сыворотки крови кроликов-реципиентов, проявлявшееся в увеличении содержания суммарной фракции пре-β- и β-ЛП и уменьшении содержания α-ЛП.

Концентрация в сыворотке крови свободного холестерина повышалась несколько быстрее, чем эфиров холестерина (в 2,4 и 2,2 раза соответственно). Преимущественное увеличение уровня свободного холестерина может иметь значение в атерогенезе [17]. Далее, известно, что понижение концентрации α-ЛП в сыворотке крови ускоряет развитие атеросклероза при воздействии атерогенных факторов [18]. Уменьшение содержания α-ЛП после введения кроликам суммарной фракции АЛП наблюдалось и в наших опытах. Вероятно, эти изменения липидо- и липопротеидограммы крови кроликов-реципиентов могут способствовать возникновению атероматозного поражения сосудов подопытных жи-

вотных при увеличении концентрации в крови атерогенных фракций липопротеидов.

Не вызывает сомнения, что увеличение содержания в сыворотке крови подопытных кроликов липидных фракций связано с повышением в ней количества пре-β- и β-ЛП, являющихся главными транспортными формами липидов в организме человека и животных. Можно предположить, что повышение концентрации липидов в крови кроликов-реципиентов обусловлено внутривенным введением избыточных количеств АЛП. В таком случае можно вычислить ожидаемое увеличение содержания в крови суммарной фракции пре-β- и β-ЛП и холестерина, зная объем циркулирующей плазмы у подо-

Т а б л и ц а 2

Содержание свободного и эстерифицированного холестерина (в мг на 1 г тканевого белка) в мышце различных отделов сердца подопытных ($n=26$) и контрольных ($n=15$) кроликов

Отдел миокарда	Свободный холестерин		Эстерифицированный холестерин	
	опыт	контроль	опыт	контроль
Левый желудочек	$6,67 \pm 0,88^{***}$	$2,96 \pm 0,45$	$4,63 \pm 0,86^*$	$2,16 \pm 0,40$
Левое предсердие	$7,92 \pm 1,11^{***}$	$2,53 \pm 0,40$	$6,36 \pm 1,30^{**}$	$2,21 \pm 0,40$
Правый желудочек	$6,70 \pm 0,80^{***}$	$3,26 \pm 0,31$	$5,72 \pm 1,10^*$	$2,67 \pm 0,49$
Правое предсердие	$10,30 \pm 1,21^{***}$	$3,87 \pm 0,37$	$9,47 \pm 1,75^*$	$4,91 \pm 0,73$
Межжелудочковая перегородка	$8,94 \pm 1,42^{***}$	$3,28 \pm 0,36$	$7,87 \pm 1,82^{**}$	$2,38 \pm 0,38$

пытных животных [1] и исходное содержание в ней суммарной фракции АЛП и холестерина, а также количество АЛП и холестерина, введенных животным. При этом следует учесть, что экзогенно введенные ЛП в организме животных-реципиентов подвергаются распаду в соответствии с периодом их полужизни, который для β-ЛП здоровых кроликов равен 14 ч [7]. Кроме того, происходит отложение части введенного холестерина в органах и тканях подопытных животных [2]. Об этом, вероятно, и свидетельствует наблюдавшееся нами увеличение количества холестерина в сердечной мышце всех исследованных отделов сердца животных-реципиентов (табл. 2). В связи с этим можно было ожидать, что фактическое содержание АЛП и холестерина в крови подопытных кроликов будет меньше, чем расчетное количество.

Т а б л и ц а 3

Изменение содержания холестерина и суммарной фракции пре-β- и β-ЛП (в мг) в полном объеме плазмы крови кроликов после введения гомологичных АЛП

Группа опытных кроликов	Исходное количество		Расчетное количество		Фактическое количество	
	пре-β-и β-ЛП	холестерин	пре-β-и β-ЛП	холестерин	пре-β-и β-ЛП	холестерин
Группа А ($n=12$)	$267 \pm 40,8$	$98,6 \pm 18,1$	$578 \pm 97,9$	$147 \pm 20,4$	1195 ± 179	$337 \pm 29,8$
P					$<0,01$	$<0,001$
Группа Б ($n=14$)	$269 \pm 38,5$	$103,0 \pm 9,70$	$886 \pm 86,8$	$215 \pm 16,7$	$589 \pm 48,8$	$157 \pm 18,6$
P					$<0,01$	$<0,05$

Примечание. P — различие между фактическим и расчетным количеством.

Как видно из табл. 3, у некоторых экспериментальных животных (14 из 26, группа Б) определенное в сыворотке крови суммарное содержание пре-β- и β-ЛП и холестерина действительно было статистически достоверно ниже ожидаемой расчетной величины. Однако у других подопытных кро-

ликов (12 из 26, группа А) фактическое их содержание статистически значимо превосходило расчетные значения.

Таким образом, сопоставление фактического и расчетного содержания суммарной фракции пре- β - и β -ЛП и холестерина дает основание предположить, что длительное внутривенное введение кроликам АЛП и возникающая при этом гиперлипопротеидемия, возможно, вызывают у некоторых животных-реципиентов такие вторичные изменения липидного обмена, которые приводят к дальнейшему повышению в крови уровня АЛП и липидов. Наше предположение подтверждается изменениями метаболизма липопротеидов, обусловленными развитием экспериментальной гиперхолестеринемии [6, 7]. Следует отметить, что увеличение концентрации липопротеидов в крови животных-реципиентов, возможно, связано со снижением скорости их распада. Действительно, установлено, что скорость распада апопротеида введенных донорских липопротеидов низкой плотности у кроликов с гиперлипопротеидемией существенно ниже, чем у животных с неизменной концентрацией липидов в крови [19]. Замедление скорости распада β -ЛП показано при экспериментальном атеросклерозе у кроликов [7].

Поскольку мы не учитывали катаболизм, экскрецию и отложение в тканях введенных животным липопротеидов и холестерина, то расчетные величины ожидаемого увеличения суммарной фракции АЛП и холестерина в крови кроликов-реципиентов были безусловно значительно завышены и не соответствовали истинному содержанию этих веществ в плазме крови. Поэтому не исключено, что повышение содержания суммарной фракции пре- β - и β -ЛП и липидов в крови животных группы Б связано не только с введением липопротеидов извне, но и с изменениями липидного обмена, вызванными возникшей гиперлипопротеидемией.

Таким образом, длительное внутривенное введение кроликам суммарной фракции пре- β - и β -ЛП вызывает значительные изменения липидограммы сыворотки крови подопытных животных, обусловленные, вероятно, не только избыточным введением АЛП, но и возникающими при этом нарушениями липидного обмена. Предполагаемые изменения обмена могут быть связаны с замедлением катаболизма липидов. Можно предположить также, что обменные изменения, приводящие к значительному повышению содержания АЛП и холестерина сверх расчетных величин, обусловлены гиперлипопротеидемией, воспроизведенной у подопытных кроликов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельченко Д. И., Шестаков Н. В., Матвеев Г. А. — «Пробл. гематол.», 1969, № 9, с. 43—47.
2. Климов А. Н., Родионова Л. П., Петрова-Маслакова Л. Г. — «Cor et Vasa», 1966, т. 8, с. 221—226.
3. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Петрова-Маслакова Л. Г. и др. — «Вестн. АМН СССР», 1969, № 9, с. 43—50.
4. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Баньковская Э. Б. — «Лабор. дело», 1966, № 5, с. 276—279.
5. Лаптева Н. И., Савина Г. Е. — В кн.: Патологическая физиология и клиника нарушений обмена липидов. М., 1971, с. 63—67.
6. Левитова Е. Н. — В кн.: Атеросклероз и коронарная недостаточность. М., 1970, с. 24—28.
7. Левитова Е. Н., Крицман М. Г. — «Cor et Vasa», 1963, т. 5, с. 291—297.
8. Монцевичюте-Эрингене Е. В. — «Патол. физиол.», 1964, № 4, с. 71—78.
9. Покровский Е. А., Каргаполов А. В. — «Лабор. дело», 1972, № 6, с. 337—341.
10. Рыльников Ю. П. — «Кардиология», 1974, № 2, с. 100—106.
11. Burstein M., Samaille J. — «Presse méd.», 1958, v. 66, p. 974—975.
12. Burstein M., Morfin R. — «Life Sci.», 1969, v. 8, p. 345—348.
13. Dabels I., Dabels E. — «Z. ges. inn. Med.», 1972, Bd 27, s. 35—37.
14. Folch I., Lees M., Sloane-Stanley G. H. — «J. biol. Chem.», 1957, v. 226, p. 497—509.
15. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — Ibid., 1951, v. 193, p. 265—267.
16. Marsh I. B., Weinstein D. B. — «J. Lipid Res.», 1966, v. 7, p. 574—576.
17. Marquie G., Agid R., Bonnet L. — «C. R. Soc. Biol. (Paris)», 1971, v. 165, p. 713—717.
18. Miller G. G., Miller N. E. — «Lancet», 1975, v. 1, p. 16—19.
19. Portman O. W., Illingworth D., Roger A. M. — «Biochim. biophys. Acta», 1975, v. 398, p. 55—71.

Поступила 10/III 1977 г.

EFFECT OF PROLONGED ADMINISTRATION OF ATHEROGENIC FRACTIONS OF LIPOPROTEINS ON LIPID SPECTRA IN RABBIT BLOOD AND MYOCARDIUM

M. N. Kalinkin, D. I. Bel'chenko

Chair of Pathophysiology, Medical School, Kalinin

Homologous total fraction of pre- β and β -lipoproteins, isolated from intact animal blood and administered intravenously into rabbits within 1.5-2 months, caused distinct alterations in lipid spectra of rabbit-recipient blood serum. The phenomenon was manifested as an increase in concentration of all the lipid components in blood plasma, elevation in content of pre- β and β -lipoproteins in blood and decrease in content of α -lipoproteins. The alterations were apparently related not only to excessive administration of atherogenic lipoproteins but to impairments in lipid metabolism, similar to lipoproteinemia, reproduced in other experiments.

УДК 615.916*126.51.0 15.43

Р. В. Меркурьева, Л. И. Бушинская, Б. В. Аулика,
И. С. Шатерникова, Е. И. Проценко, А. А. Кулыгина,
Н. Д. Экслер

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕЙСТВИИ СЕРОУГЛЕРОДА

Институт общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР, Москва

Ингаляционное воздействие сероуглерода приводит к нарушению активности ферментов лизосомального и цитоплазматического происхождения и изменению содержания углеводовсодержащих биополимеров (гликозаминогликаны, гликопротеиды) в тканях различных органов (печень, почки, головной мозг, аорта) кроликов. Обсуждается возможная роль обнаруженных нарушений в проявлении нейротропного и гепатотропного эффектов, а также в возникновении некоторых видов отдаленных последствий (аллергенного, эмбриотоксического) при воздействии сероуглерода как одного из факторов окружающей среды.

Одним из проявлений токсического действия химических загрязнителей, относящихся к числу липотропных веществ, и, в частности, сероуглерода может быть непосредственное влияние этих соединений или их метаболитов на биологические мембраны. Изменение структурной целостности и проницаемости биомембран может быть в свою очередь одной из основных причин дисбаланса различных ферментных систем в клетке.

Несмотря на большое число работ в этой области, механизмы, затрагивающие ферментные системы различной локализации в клетке при воздействии факторов окружающей среды, до сих пор окончательно не выяснены. Нерешенным остается вопрос о роли ферментов лизосомального происхождения и энзимов, не связанных с клеточными органеллами, в развитии непосредственного токсического эффекта, а также в возникновении ряда отдаленных последствий (эмбриотоксический, атерогенный, канцерогенный, аллергенный и другие виды биологических эффектов).

Изучение этого вопроса представляет тем больший интерес, что изменение активности лизосомальных ферментов, осуществляющих катаболическую фазу обмена ряда биологически важных соединений, в том числе углеводовсодержащих биополимеров, белков и т. д. [1, 2], может способствовать нарушению обмена многих физиологически важных структурных элементов, например ганглиозидов мозга, гликозаминогликанов, гликопротеидов и др. Подобные нарушения, чреватые неблагоприятными последствиями для функционального состояния клетки, могут привести к развитию предпатологических и болезненных явлений [3, 4, 5].

Не менее существенная роль в биологическом действии факторов окружающей среды может принадлежать и растворимым ферментным системам, осуществляющим обмен белково-связанных углеводов, которые являются минорным компонентом клеточных мембран [6, 7, 8]. Особый интерес в

этом плане представляет исследование активности фермента цитозоля — альдолазы нейраминовой кислоты, катализирующей расщепление свободной N-ацетилнейраминовой кислоты, которая наряду с другими моносахарами (гексозамины, нейтральные гексозы, фукоза и др.) относится к числу мембраносвязанных углеводов и является структурным компонентом гликопротеидов [9, 10].

В настоящей работе изложены результаты исследования активности ферментов, локализованных в лизосомах и растворимых в цитозоле, а также содержания углеводов, связанных с белками, на экспериментальной модели ингаляционного действия одного из распространенных химических загрязнителей — сероуглерода. Это соединение оказывает явно выраженное нейротропное и гепатотропное действие, а также способствует возникновению атерогенного, эмбриотоксического и гонадотоксического эффектов [11, 12, 13]. Метаболические механизмы действия сероуглерода на изучаемые ферментные системы лизосом и цитозоля не выяснены.

М е т о д и к а

Эксперимент выполнен на 32 кроликах, подвергавшихся в течение 6 нед постоянному ингаляционному воздействию сероуглерода — на уровне пороговой дозы ($0,2 \text{ мг/м}^3$) и в 10 раз большей (2 мг/м^3). Биохимическое исследование проводили в печени, почках, головном мозге, аорте и сыворотке крови кроликов через 1, 2 и 6 нед действия сероуглерода в высокой дозе и через 6 нед после начала воздействия его в малой концентрации.

В гомогенатах тканей определяли активность ферментов лизосомального происхождения: гиалуронидазы (КФ 3.2.1.21) [14], N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (КФ 3.2.1.30) [15], β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21), β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) [16] и кислой фосфатазы (КФ 3.2.3.2) [17]. Активность отдельных ферментов определяли во фракции лизосом печени и надосадочной фракции с добавлением тритона X-100 (конечная концентрация 0,1%) и без детергента, что позволяет оценить степень прочности связи энзимов с лизосомальными мембранами и эффект лабильности [1].

Наряду с этим определяли содержание гексуроновых кислот в тканях [18], что отражает суммарное количество гликозаминогликанов, активность растворимого фермента гиалоплазмы — альдолазы N-ацетилнейраминовой кислоты [19], а также содержание углеводов, связанных с белками — N-ацетилнейраминовой кислоты [20], аминсахаров и гексоз [21]. Содержание N-ацетилнейраминовой кислоты и активность альдолазы этой кислоты определяли в различных отделах головного мозга кроликов — сером, белом веществе и обонятельных луковицах. В сыворотке крови исследовали активность гиалуронидазы и кислой фосфатазы, а также концентрацию N-ацетилнейраминовой кислоты, гексозаминов, гексоз гликопротеидов по методам, указанным выше. Результаты обработаны статистически.

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

Исследование ферментных систем лизосомального происхождения у опытных кроликов показало, что изменение энзиматической активности находится в зависимости от вида фермента, его органной принадлежности, дозы и времени воздействия сероуглерода (рис. 1). Наиболее существенные изменения обнаружены со стороны гиалуронидазы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы, активность которых в ткани печени и почек на ранних сроках действия сероуглерода снижалась, а впоследствии нарастала, превышая в ряде случаев нормальный уровень.

Активность кислых гликозидаз — β -глюкозидазы и β -галактозидазы, а также кислой фосфатазы изменялась преимущественно в сторону повышения, что особенно заметно проявлялось под влиянием высокой дозы сероуглерода (2 мг/м^3) в ткани головного мозга и почках, где активность указанных ферментов превышала контрольный уровень в среднем в 2,2—2,4 раза. Исключение составляет β -галактозидаза печени, активность которой через 6 нед воздействия сероуглерода в малой дозе ($0,2 \text{ мг/м}^3$) была понижена в 5,7 раза по сравнению с контролем.

Изменение активности лизосомальных гликозидаз печени происходит в основном за счет свободной (не связанной с лизосомами) активности, что дает основание сделать предположение о лабильности мембран лизосом под действием сероуглерода.

Определение содержания гликозаминогликанов в печени подопытных кроликов показало, что изменение активности лизосомальных ферментов, принимающих участие в реакции их гидролитического расщепления, сопровождалось накоплением гексуроновых кислот, что особенно заметно в ранние сроки действия сероуглерода (в 4,2 раза; $P < 0,001$).

В почечной ткани кроликов через 6 нед воздействия сероуглерода наблюдается достоверное понижение содержания белково-связанных углеводов — гексоз и гексозаминов (рис. 2). Накопление гексуроновых кислот (в 3,5 раза) отмечено в ткани аорты кроликов через 6 нед действия сероуглерода.

Обнаруженные изменения содержания углеводов, связанных с белка-

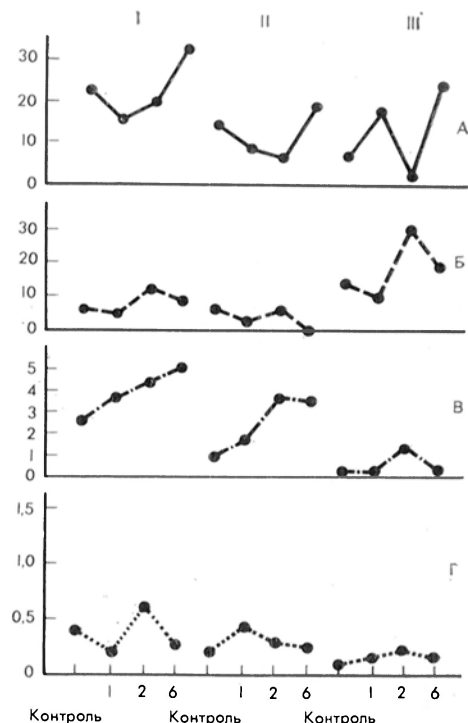


Рис. 1. Активность лизосомальных ферментов в тканях кроликов в зависимости от времени воздействия сероуглерода (2 мг/м³).

А — N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза (в мкг п-нитрофенола на 1 мг белка в час); Б — гиалуронидаза (в мкг N-ацетилглюкозамина на 1 мг белка за 18 ч); В — β-глюкозидаза (в мкг п-нитрофенола на 1 мг белка в минуту); Г — β-галактозидаза (в мкг п-нитрофенола на 1 мг белка в минуту). I — печень, II — почки, III — головной мозг.

По оси абсцисс — срок воздействия (в нед); по оси ординат — активность ферментов в указанных выше единицах.

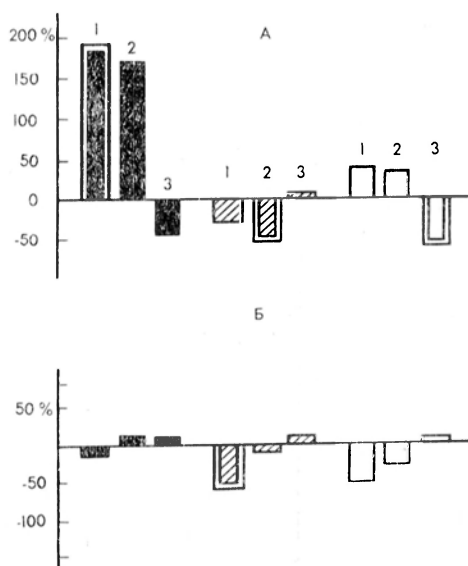


Рис. 2. Изменение содержания углеводов, связанных с белками, в тканях кроликов через 6 нед ингаляционного воздействия сероуглерода.

А — концентрация сероуглерода 2 мг/м³, Б — концентрация сероуглерода 0,2 мг/м³. По оси ординат — изменение (в % от контроля): 1 — гексозамины; 2 — гексозы, связанные с белками; 3 — N-ацетилнейраминная кислота. Черные столбики — печень, заштрихованные — почки, светлые — головной мозг, столбики в рамке — статистически достоверные изменения ($P < 0,05$).

ми, и активности лизосомальных гликаногидролаз и, следовательно, катаболизма гликозаминогликанов в ткани головного мозга, почек и печени при интоксикации сероуглеродом может способствовать нарушению функционального состояния центральной нервной системы и органов детоксикации. Это касается, в частности, выделительной функции почек, поскольку в настоящее время установлено участие гликозаминогликанов в осуществлении проницаемости структур мозгового вещества почек и процессах реабсорбции воды [22]. Известно также, что увеличение концентрации гликозаминогликанов, метаболизм которых имеет большое значение в обеспечении нормальной деятельности сосудистой системы, может быть связано с усиленным отложением этих биополимеров в соединительнотканной интимае сосудов, что характерно для склеротических изменений сосудистой стенки и возникновения предынфарктных состояний [23].

Следует отметить, что на отдельных сроках действия сероуглерода в одном и том же органе наблюдалось разнонаправленное изменение активности функционально связанных гликозидаз — гиалуронидазы и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, когда повышение активности одного фермента сопровождается понижением активности другого. Можно полагать, что этот феномен, имевший место в печени кроликов через 6 нед, в почках через 2 и 6 нед и в ткани головного мозга через 2 нед воздействия сероуглерода в большой дозе (см. рис. 1), является, по-видимому, выражением адаптационных реакций со стороны ферментных систем лизосом жизненно важных органов. Наиболее чувствительной к воздействию сероуглерода ферментной системы лизосом в ткани головного мозга, согласно полученным результатам, является гиалуронидаза, активность которой через 2 нед действия сероуглерода в большой дозе была достоверно снижена на 68 % по сравнению с ее величиной у контрольных кроликов. Аналогичные, но менее выраженные изменения выявлены в эти же сроки эксперимента в ткани почек.

Содержание N-ацетилнейраминовой кислоты (НК) в тканях и сыворотке крови и активность альдозаза НК в тканях и сыворотке крови кроликов, подвергавшихся воздействию сероуглерода в концентрации 2 мг/м³

Объект исследования	Биохимические показатели	Время воздействия, (нед.)			
		контроль	1	2	3
Печень	НК	57±2 (7)	73±7 (4)	83±3 (4)*	67±7 (5)
	Альдолаза НК	21±4 (7)	12±2 (4)*	19±3 (4)	12±1 (5)*
Обонятельные луковицы мозга	НК	97±8 (5)	131±6 (4)*	123±26 (3)	92±2 (4)
	Альдолаза НК	17±3 (4)	21±7 (4)	18±4 (3)	14±2 (5)
Серое вещество мозга	НК	122±2 (13)	92±19 (4)	123±17 (4)	120±4 (5)
	Альдолаза НК	18±2 (11)	11±2 (4)*	13±3 (4)	10±2 (5)*
Белое вещество мозга	НК	122±2 (13)	119±5 (4)	109±6 (4)	107±7 (5)
	Альдолаза НК	18±2 (11)	19±4 (4)	9±2 (4)*	13±2 (5)
Сыворотка крови	НК	71±2 (21)	68±2 (4)	94±4 (7)*	83±5 (5)*

Примечание. * $P < 0,05$. Содержание N-ацетилнейраминовой кислоты выражено в мг%. Активность альдозаза НК выражена в процентах расщепления свободной N-ацетилнейраминовой кислоты. В скобках число животных.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что изменение активности лизосомальных ферментов при действии сероуглерода сопровождается нарушением активности ферментной системы, не связанной с субклеточными структурами — альдозаза N-ацетилнейраминовой кислоты. Наиболее существенные и ранние изменения характерны для коры головного мозга, в которой обнаружено одновременное снижение (в среднем на 35 %) как активности фермента ($P < 0,01$), так и содержания N-ацетилнейраминовой кислоты ($P < 0,001$) уже через неделю действия сероуглерода в высокой концентрации. Достоверное угнетение активности альдозаза N-ацетилнейраминовой кислоты наблюдалось и в более отдаленные сроки — через 6 нед после начала эксперимента (см. таблицу). Выявленные нарушения, по-видимому, указывают на понижение интенсивности обмена N-ацетилнейраминовой кислоты в коре головного мозга при воздействии сероуглерода.

Представленные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности обмена белково-связанных углеводов и особенно N-ацетилнейраминовой кислоты в тканях головного мозга к токсическому действию сероуглерода. Это предположение находится в соответствии с имеющимися в литературе сведениями, что через N-ацетилнейраминную кислоту ганглиозидов мозга

осуществляется связь некоторых видов нейротоксинов со структурами центральной нервной системы [24]. Подтверждением этого служат и результаты проведенного нами сравнительного анализа результатов биохимического и нейрофизиологического исследований головного мозга экспериментальных животных при изучении первичных и вторичных ответов вызванного потенциала зрительной коры головного мозга. Так, понижение амплитуды первичного ответа вызванного потенциала, которое расценивается как повышение возбудимости центральной нервной системы, сопровождается снижением активности альдолазы N-ацетилнейраминовой кислоты в белом веществе (через 2 нед) и в сером веществе головного мозга кроликов (через 6 нед) при ингаляционном поступлении в организм сероуглерода (2 мг/м^3). Такое соотношение, возможно, обусловлено нейрохимическими механизмами нейротропного влияния сероуглерода на центральную нервную систему.

Согласно современным представлениям, изменение архитектоники и стабильности биомембран является одним из факторов, определяющих активность мембраносвязанных ферментов [23]. Установленное нами нарушение активности кислых гидролаз лизосомального происхождения и изменение обмена углеводсодержащих биополимеров в печени, почках и головном мозге экспериментальных животных может рассматриваться, по нашему мнению, как один из механизмов действия сероуглерода, который, по-видимому, оказывает повреждающее влияние на целостность и проницаемость мембран лизосом. Эти нарушения могут служить материальной основой неблагоприятных отдаленных последствий для организма в целом, в частности эмбриотоксического эффекта, возникновение которого под влиянием сероуглерода доказано в экспериментальных условиях [13]. Возможно, что нарушения обмена веществ под влиянием химических загрязнителей могут способствовать возникновению предрасположенности организма к развитию тех или иных патологических состояний, тем более что в настоящее время известны наследственные энзимопатии, вызванные генетическим дефектом изученных нами лизосомальных гидролаз [25]. Потенциальная опасность токсических факторов окружающей среды для человека, с точки зрения возможного возникновения отдаленных последствий [26], обуславливает необходимость дальнейших исследований в этой области, что позволяет более полно расшифровать биологическую значимость изменения ферментных систем различной клеточной локализации при воздействии химических факторов окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский А. А., Конь И. Я., Соловьев В. Н. — «Бюлл. exper. биол.», 1974, № 3, с. 49—52. — 2. Hayashi M., Hiroi J., Natori J. — «Nature, New Biol.», 1973, v. 242, p. 163—166. — 3. Меерсон Ф. З., Панченко Л. Ф., Голубева Л. Ю. и др. — «Кардиология», 1970, № 7, с. 71—79. — 4. Кайнова А. С. — «Вопр. ревмат.», 1972, № 2, с. 83—87. — 5. Учитель И. Я. — «Ж. микробиол.», 1973, № 3, с. 64—70. — 6. Milson A. W., Wynn C. H. — «Biochem. Soc. Transactions», 1973, v. 6, p. 426—428. — 7. Wingvist L., Eriksson L. C., Dalher L. — «FEBS Letters», 1974, v. 42, p. 27—31. — 8. Kawasaki T., Sugahara K., Okumura T. et al. — «J. Biochem. (Tokyo)», 1974, v. 75, p. 437—439. — 9. Ostrowski W., Wasyl L., Weber M. et al. — «Biochim. biophys. Acta», 1970, v. 221, p. 2. — 10. Ярославский В. К. Влияние сероуглерода на специфические функции организма работников. Дис. канд. Л., 1970. — 11. Dzimbor E., Cyszkiewicz J., Ostrowski W. — «Experientia (Basel)», 1970, v. 26, p. 947—948. — 12. Милков М. Е., Харламова С. Ф., Сайтанов А. О. и др. — «Гиг. труда», 1974, № 11, с. 20—23. — 13. Сальникова Л. С., Чиркова Е. М. — Там же, № 12, с. 34—37. — 14. Wopner E., Santeu J. — «Clin. chim. Acta», 1966, v. 13, p. 746—752. — 15. Виха Г. В., Каверзнева Е. Д., Хорлин А. Я. — «Биохимия», 1971, т. 36, № 1, с. 33—42. — 16. Покровский А. А. — В кн.: Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. М., 1969, с. 471. — 17. Bassey O., Lowry O. H., Brock M. Z. — «J. biol. Chem.», 1946, v. 164, p. 321—329. — 18. Bitter T., Muir H. — «Analyt. Biochem.», 1965, v. 10, p. 15—22. — 19. Цветкова И. В. — «Биохимия», 1965, т. 30, № 2, с. 407—414. — 20. Меркурьева Р. В., Базанов Е. А. — «Вопр. мед. химии», 1968, № 1, с. 95—98. — 21. Меркурьева Р. В. Гликозаминогликаны и гликопротеиды при

некоторых заболеваниях и повреждениях опорно-двигательного аппарата. Дис. докт. М., 1973. — 22. Mogaard J. C., Potier M. F. — «J. Physiol. (Paris)», 1968, v. 104, p. 297—321. — 23. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975. — 24. Крыжановский Г. Н., Розанов А. Я., Бондарчук Г. Н. — «Бюлл. exper. биол.», 1973, № 12, с. 26—29. — 25. Harris G. S., Palmer W. A. — «Clin. Sci.», 1971, v. 40, p. 293—303. — 26. Бочков Н. П., Журков В. С., Яковленко К. Н. и др. — «Докл. АН СССР», 1974, т. 218, с. 215.

Поступила 1/IV 1977 г.

ACTIVITY OF LYSOSOMAL AND CYTOPLASMIC ENZYMES IN EXPERIMENTAL INTOXICATION WITH CARBON DISULFIDE

R. V. Merkur'eva, L. I. Bushinskaya, B. V. Aulika, I. S. Shaternikova, E. I. Protsenko, A. A. Kulygina, N. D. Exler

A. N. Sysin Institute of General and Communal Hygiene, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activity of lysosomal enzymes and content of carbohydrate containing biopolymers (glycosaminoglycans, glycoproteins) were altered in various tissues (liver, kidney, brain, aorta) of experimental animals intoxicated with carbon disulfide. Possible role of the impairments observed, related to neurotropic and hepatotoxic effects, is discussed. Subsequent development of atherogenic and embryotoxic effects of carbon disulfide — one of contaminants of surroundings — are considered.

УДК 616.361.611.014.41.07:547.963.4

Н. П. Суббота, А. М. Белоус

КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОХРОМОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЯХ ХРАНЕНИЯ ГОМОГЕНАТОВ КОРЫ ПОЧКИ КРЫСЫ

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков

Показано понижение концентрации цитохромов (a , $c + c_1$) в гомогенатах коры почки крысы, зависящее от сроков и условий их низкотемпературного хранения. Подобраны оптимальные условия для длительного хранения биоматериала, при которых концентрация исследованных цитохромов изменяется в незначительной степени.

Для решения ряда медицинских и биологических задач, связанных с исследованием биоэнергетики клеток и тканей, возникает необходимость в длительном хранении соответствующего биоматериала, поскольку не всегда удастся произвести определение исследуемых параметров в день опыта. В связи с этим представляет значительный интерес изучение изменения концентрации цитохромов при различных сроках и условиях низкотемпературного хранения биоматериала.

Цель данной работы — исследовать изменение концентрации цитохромов при низкотемпературном хранении гомогенатов коры почки и подобрать наиболее оптимальные условия длительного хранения их под защитой диметилсульфоксида (ДМСО), глицерина и полиэтиленоксида с молекулярным весом 100 (ПЭО-100).

Методика

Опыты проводили на 50 беспородных белых крысах (самцы и самки) массой 150—180 г. Гомогенат получали на холоду (2—4°C) при соотношении ткани и среды выделения 1 : 2. Среда содержала (в мМ): сахара — 300, версен — 0,2, Φ_n — 2, рН 7,4. В течение всего опыта гомогенат хранили в холодильной комнате на льду. Концентрацию цитохромов в тканевых гомогенатах коры почки определяли методом дифференциальной спектрофотометрии. Запись спектров производили при добавлении 50 мг ткани на 1 мл среды инкубации (состав среды инкубации соответствует составу среды выделения). Для определения концентрации использовали α -полосы дифференциального спектра поглощения цитохромов (восстановленные минус окисленные). Спектры регистрировали при комнатной температуре. В одну из кювет добавляли 3 мМ цианида, 40 мкМ ДНФ, 5 мМ сукцината, в другую — 240 мкМ

ДНФ, 4,8 мМ амиталя. Концентрацию цитохромов в гомогенатах определяли по Евтодиенко и Моховой [1]:

$$C = \frac{\Delta D \times 2,3}{K \times l},$$

где C — концентрация цитохрома (в мМ); D — оптическая плотность; K — миллимолярный десятичный коэффициент поглощения (в ед. опт. пл/см/мМ). Для цитохрома a $K=14$, для цитохромов $c+c_1$ $K=18$. Определяли также величины:

$$\frac{\Delta D_{554} \times 2,3}{19 \times l} \text{ и } \frac{\Delta D_{550} \times 2,3}{22 \times l},$$

в которые преимущественный вклад дает поглощение цитохромов c_1 и c соответственно. Длина оптического пути (l) в наших экспериментах равна 0,7 см.

Гомогенат коры почки перед замораживанием выдерживали 30 мин на холоду в 10% растворе ПЭО-100 и глицерина или 15 мин — в 10% растворе ДМСО. Замораживание проводили медленно, со скоростью 1—2°C в 1 мин до —12°C либо быстро — 300—400°C в 1 мин до —196°C. При двухэтапном режиме на 1-м этапе замораживание проводили со скоростью 1—2°C в 1 мин до конца плато кривой термограммы равномерного охлаждения гомогената, на 2-м — быстро, со скоростью 300—400°C в 1 мин до —196°C (рис. 1). Материал хранили 24 ч при —196°C и 2 ч при —12°C, после чего производили оттаивание на водяной бане при 37°C. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики [2].

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены данные об изменении концентрации цитохромов при хранении гомогенатов коры почки на холоду (2—4°C).

Как видно из приведенных данных, хранение гомогената на льду в течение даже 3 ч вызывает некоторое снижение концентрации цитохромов, а через 24 и 48 ч это снижение значительное. Можно предположить, что эти

изменения связаны со «старением» мембран, нарушением их проницаемости либо выходом ферментов из мембран. Например, Чех [3], изучая изменение концентрации цитохромов при хранении мышцы свиньи при 1°C, показал, что спустя 24 ч теряется 33 % цитохрома c , а через 48 ч — 47 %.

Следует отметить, что при хранении гомогената в узкой пробирке (толщина слоя гомогената не менее 2 см) с притертой

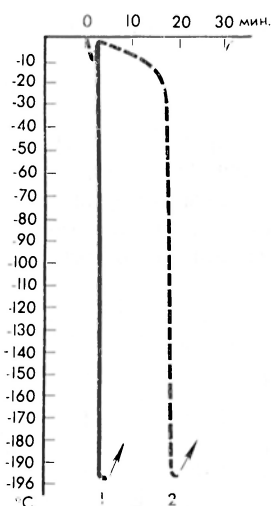


Рис. 1. Кривые скоростей замораживания гомогената коры почки крысы. 1 — одноэтапно; 2 — двухэтапно.

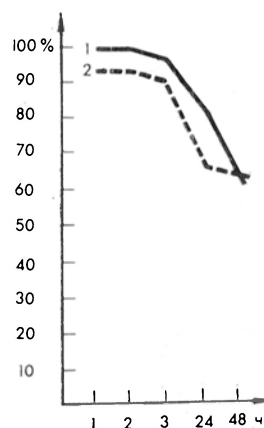


Рис. 2. Изменение концентрации цитохромов a (1) и $c+c_1$ (2) при хранении гомогенатов коры почки крысы на холоду.

пробкой снижение концентрации исследованных цитохромов было несколько менее выраженным, чем при хранении в посуде с широким горлом (толщина слоя 0,4—0,5 см).

Поскольку в последнее время для длительного хранения биоматериала широко используют низкие температуры, мы применили несколько вариан-

тов замораживания биоматериала и хранили его различное время. При этом использовали режимы замораживания — отогрева, описанные нами ранее при изучении дыхания и окислительного фосфорилирования в гомогенате коры почки крысы [4].

На рис. 3, а показано изменение концентрации цитохромов при медленном замораживании гомогената (1—2°C в 1 мин) до —12°C, хранении при этой температуре и быстром отогреве. Как видно, концентрация цитохрома *a* при таких условиях хранения уменьшалась на 23 %, а концентрация цитохромов *c* + *c*₁ — на 35 %. При быстром одноэтапном замораживании

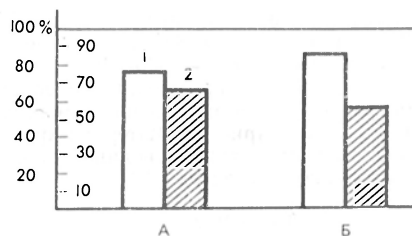


Рис. 3. Концентрация цитохромов *a* (1) и *c* + *c*₁ (2) при медленном (до —12°C, А) и быстром (до —196°C, Б) замораживании и хранении гомогенатов коры почки крысы и быстром отогреве.

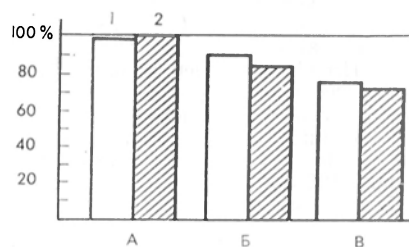


Рис. 4. Влияние криопротекторов ДМСО (А), глицерина (Б) и ПЭО-100 (В) на изменение концентрации цитохромов *a* (1) и *c* + *c*₁ (2) при быстром одноэтапном замораживании гомогенатов коры почки крысы.

гомогената (рис. 3, б) концентрация цитохрома *a* понижалась на 15 %, а цитохрома *c* + *c*₁ — на 47 %.

С целью предупреждения выявленных выше криповреждений в цитохромной системе и поиска оптимальных условий хранения гомогенатов мы использовали низкотемпературные криопротекторы — ДМСО, глицерин, ПЭО-100 (рис. 4). Было выяснено, что ДМСО оказывает наиболее выраженный криозащитный эффект при быстром одноэтапном замораживании гомогенатов; в этом случае проявляется его некоторое стабилизирующее действие на систему цитохромов. При этом несколько уменьшалась только концент-

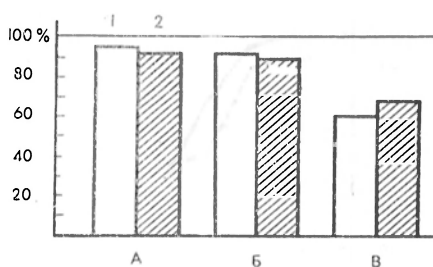


Рис. 5. Влияние криопротекторов ДМСО (А), глицерина (Б) и ПЭО-100 (В) на изменение концентрации цитохромов *a* (1) и *c* + *c*₁ (2) при двухэтапном замораживании гомогенатов коры почки крысы.

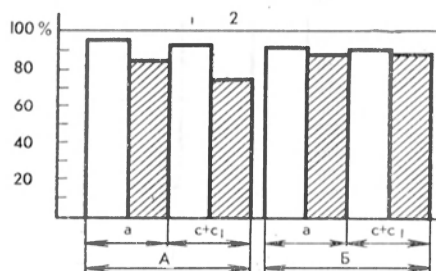


Рис. 6. Изменение концентрации цитохромов *a* и *c* + *c*₁ через 24 ч (1) и 2 мес (2) хранения при —196°C гомогенатов коры почки под защитой ДМСО (А) и глицерина (Б).

рация цитохрома *a*, в то время как концентрация цитохромов *c* + *c*₁ не изменялась. Глицерин также был эффективен, однако его криозащитное действие было несколько хуже — концентрация исследованных цитохромов понижалась в среднем на 12—18 %. ПЭО-100 был неэффективен: концентрация цитохромов оставалась практически такой же, как при замораживании гомогенатов без криопротекторов.

На рис. 5 показано изменение концентрации цитохромов при двухэтапном замораживании гомогенатов коры почки крысы. В этом случае ДМСО

оказывал также наиболее выраженное криозащитное действие — концентрация цитохромов $c + c_1$ понижалась на 7 %, что соответствует уменьшению поглощения 550 нм, в которое преимущественный вклад дает цитохром c . Глицерин предохранял цитохромы от разрушения на 90—92 %. ПЭО-100 и в этом случае был малоэффективен.

Поскольку двухэтапный режим замораживания с 10 % глицерином и ДМСО оказался весьма эффективным, мы хранили гомогенаты коры почки при -196°C в течение 2 мес (рис. 6). Было выяснено, что при хранении гомогенатов под защитой глицерина концентрация цитохрома a и $c + c_1$ уменьшается в незначительной степени (на 4 %), а при хранении под защитой ДМСО — на 14 и 17 % соответственно. Следовательно, при длительном хранении биоматериала более оптимальным является хранение его при -196°C в 10 % растворе глицерина.

Более низкая эффективность ДМСО, чем глицерина, при длительном хранении материала может объясняться несколькими причинами, в частности влиянием ДМСО на структурное состояние липидов и белковых компонентов мембран [5] либо эффектом «микрорасплаивания» жидкой фазы мембран и цитоплазмы клетки [3, 6].

Таким образом, в процессе замораживания и хранения биоматериала концентрация цитохромов в дыхательной цепи митохондрий изменяется поразному в зависимости от условий и длительности хранения гомогенатов. Низкотемпературная инактивация системы цитохромов, локализованных в митохондриальной мембране, может быть обусловлена несколькими причинами. Низкотемпературное воздействие изменяет структурное состояние мембран, которое может в свою очередь нарушать ассоциативные связи между отдельными ферментами или их комплексами. Не исключено, что уменьшение концентрации цитохромов при $2-4^\circ\text{C}$ связано с их выходом в межмембранное пространство, где они подвергаются неполному окислению либо распаду на более мелкие фрагменты, теряя при этом свои специфические свойства. Выявленные нами ранее изменения дыхательной активности митохондрий при замораживании и низкотемпературных условиях хранения биоматериала [4] позволяют предположить, что одной из причин, ведущих к значительному нарушению дыхательной активности митохондрий, является уменьшение концентрации цитохромов в электротранспортной цепи [3].

Результаты настоящей работы позволяют рекомендовать для низкотемпературного хранения гомогенатов определенные условия с целью последующего изучения в них концентрации цитохромов. При небольших сроках хранения (до 48 ч) следует применять 10 % раствор ДМСО, используя при этом одно- или двухэтапный режим замораживания и быстрый отогрев. Для длительного хранения гомогенатов (до 2 мес) следует использовать двухэтапный режим замораживания гомогенатов, применяя в качестве криопротектора 10 % раствор глицерина.

Авторы выражают глубокую благодарность заведующему отделом биоэнергетики проблемной межфакультетской лаборатории биоорганической химии и молекулярной биологии им. Н. А. Белозерского Московского университета члену-корр. АН СССР В. П. Скулачеву за предоставление возможности выполнения данной работы и канд. физ.-мат. наук Е. Н. Моховой за помощь в освоении методов и участие в обсуждении полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евтодченко Ю. В., Мохова Е. Н. — В кн.: Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота. М., 1967, с. 35. — 2. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1967. — 3. Cheach H. S. — «FEBS Letters», 1971, v. 19, p. 105—108. — 4. Лемешко В. В., Бондаренко В. А., Суббота Н. П. и др. — В кн.: Кробиология и криомедицина. Вып. 2. Киев, 1976, с. 33—37. — 5. Weipert N. D., Lu M. J., Rosoff M. — «J. pharm. Sci.», 1972, v. 61, p. 1097—1101. — 6. Хургин Ю. И., Азизов Ю. М., Абатуров Л. В. и др. — «Биофизика», 1972, № 3, с. 390—395.

Поступила 14/1 1977 г.

CONTENT OF CYTOCHROMES IN RAT KIDNEY CORTEX AT VARIOUS PERIODS AND LOW-TEMPERATURE CONDITIONS OF STORAGE

N. P. Subbota, A. M. Belous

Institute of Cryobiology and Cryomedicine Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Content of cytochromes (a, c+c₁) was decreased in rat kidney cortex homogenates, depending on periods and conditions of storage. Optimal conditions were chosen for prolonged storage of the biomaterial. Under these conditions concentrations of the cytochromes were altered only slightly.

УДК 612-398.132

А. А. Кричевская, А. И. Лукаш, Н. В. Пушкина,
К. Б. Шерстнев

СПОНТАННОЕ ДЕЗАМИДИРОВАНИЕ γ -ГЛОБУЛИНА

Кафедра биохимии Ростовского университета

Препарат γ -глобулина сыворотки крови человека инкубировали в термостате при 37°C в течение 15, 30, 45, 60 и 72 сут. В нулевое время и указанные сроки в белке определяли количество легкогидролизуемых и трудногидролизуемых амидных групп и прирост аминокислот. В каждый срок контролировали стерильность препарата. Установлено спонтанное дезамидирование γ -глобулина в процессе его инкубации, которое приводит к увеличению отрицательного заряда и изменению электрофоретической подвижности белка. Атакуемость белка протелином возрастает по мере уменьшения количества амидных групп в белке. Предполагается, что спонтанное дезамидирование является одной из причин «старения» белковых молекул.

До настоящего времени не установлены молекулярные механизмы, лежащие в основе «старения» белковых молекул. Робинсон и соавт. предположили, что спонтанное дезамидирование белков определяет время их жизни и соответственно старение организма [1]. В своих выводах авторы основывались на опытах с низкомолекулярными синтетическими пептидами [2, 3]. В то же время известно, что амидированность тканей изменяется в ходе индивидуального развития и при патологических состояниях организма [4—6]. Для раскрытия биологической значимости этих процессов представляется важным определение возможности спонтанного дезамидирования нативного высокомолекулярного белка. Объектом нашего исследования мы выбрали γ -глобулин сыворотки крови.

Методика

Использовали ампулированный противокоревой γ -глобулин сыворотки крови человека, полученный в Ростовском научно-исследовательском институте эпидемиологии, микробиологии и гигиены, серия 205-2. Каждая ампула содержала 1,5 мл 10,16% раствора белка в 0,9% NaCl. Ампулы помещали в термостат при 37°C. В нулевое время и через 15, 30, 45, 60 и 72 сут вскрывали по 10 ампул. Одновременно в каждый срок контролировали стерильность препаратов. Из раствора каждой ампулы белок осаждали 6% трихлоруксусной кислотой (ТХУ). В безбелковом центрифугате прирост аммиака определяли модифицированным методом Зелигсона [7]. Одновременно определяли содержание Фолин-положительных продуктов расщепления белка [8]. Осадок последовательно промывали этанолом, смесью этанола с эфиром (1 : 2), трижды эфиром и высушивали при 37°C. В препарате определяли фракции амидных групп после гидролиза в 1 н. H₂SO₄ при 100°C в течение 10 и 180 мин [9]. Одновременно в препаратах γ -глобулина после ферментативного гидролиза его протелином¹, лишенным амидазной активности, определяли дикарбоновые аминокислоты в автоматическом анализаторе аминокислот ААА-881 «Микротехна» (ЧССР). Содержание аминокислот рассчитывали на аминный азот пробы [10]. Условия ферментативного гидролиза: отношение фермент : субстрат 1 : 200, рН 8,0, 0,01 М Са²⁺, инкубация 24 ч при 37°C. Электрофорез γ -глобулина каждой пробы осуществляли в колонке для изоэлектрического фокусирования в трис-глициновом буфере рН 8,4 в градиенте сахарозы. Атакуемость γ -глобулина протелином определяли инкубированием белка пробы с ферментом в течение 1 ч. В пробах определяли прирост аминного азота [10].

¹ Протелин — препарат протеолитических ферментов бактериального происхождения, аналогичный препарату проназа. Получен в Институте органической химии АН СССР.

Результаты и обсуждение

γ -Глобулин содержит 127 амидных остатков [11]. Исследуемый нами препарат, по нашим данным, содержал 119,1 моль амидов на 1 моль белка. По скорости гидролиза в 1 н. H_2SO_4 при $100^\circ C$ различают две фракции амидов — легкогидролизуемые (ЛАГ) и трудногидролизуемые (ТАГ). В указанных условиях гидролиза первые освобождают весь аммиак за 10—20 мин, вторые—за 2—3 ч [9]. Нами показано, что источником ЛАГ в белках является аспарагин, источником ТАГ — глутамин [12, 13]. В исследованном нами γ -глобулине количество ЛАГ было равно 33,1 моль, ТАГ—86,0 моль амидов на 1 моль белка. Ход спонтанного дезамидирования γ -глобулина представлен на рис. 1. Рассчитанный период полужизни суммы амидов (САГ) был равен 60 сут, фракции ЛАГ — 36 сут, ТАГ — 65 сут.

Таблица 1

Прирост дикарбоновых аминокислот в γ -глобулине, инкубированном при $37^\circ C$, моль кислоты на 1 моль аминокислотного азота

Время инкубации, сут	Прирост аспарагиновой кислоты	Прирост глутаминовой кислоты
0	0,042	0,097
15	0,060	0,095
30	0,069	0,118
45	0,067	0,120
60	0,075	0,152

Уменьшению ЛАГ и ТАГ в препаратах белков соответствует прирост аспарагиновой и глутаминовой кислот (табл. 1). Прирост аспарагиновой кислоты соответствует дезамидированию ЛАГ, прирост глутаминовой

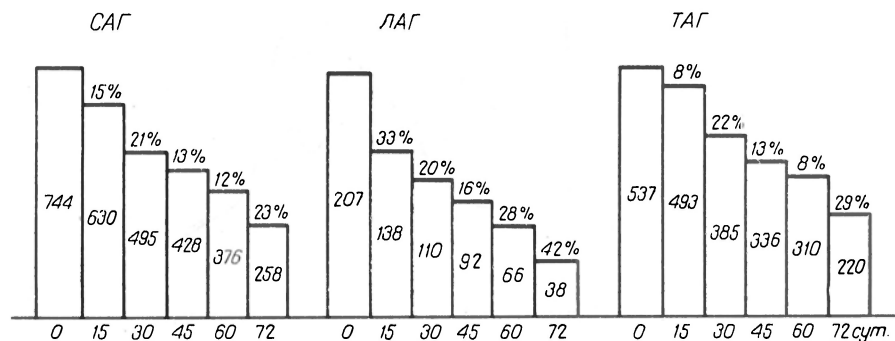


Рис. 1. Изменение амидированности γ -глобулина при инкубации.

Цифры в столбиках — амидные группы (в ммоль на 1 г белка); проценты — изменения по отношению к предыдущему сроку. Все изменения достоверны ($P < 0,001$).

кислоты — ТАГ. Это еще раз подтверждает наши представления о том, что в белковых молекулах аспарагин дезамидируется за 10—20 мин, а глутамин — за 2—3 ч [12, 13].

Уменьшение общей амидированности γ -глобулина соответствует увеличению количества свободного аммиака в пробах. Спонтанное дезамидирование белка приводит к увеличению его отрицательного заряда и изменению свойств. Это подтверждается сдвигом субфракций белка к катоду при электрофорезе (рис. 2).

Изменение свойств γ -глобулина увеличивает его атакуемость протеином на 11,3 % к 15-му дню и на 36 % к 60-му дню инкубации белка при $37^\circ C$.

В табл. 2 представлены данные о содержании в препарате γ -глобулина на разных этапах его инкубации низкомолекулярных Лоури-положительных соединений — пептидов и ароматических аминокислот. Отсутствие статистически достоверного их прироста (3,7 % за 72 сут) позволяет исключить

протеолиз из числа факторов, ответственных за обнаруженную модификацию свойств γ -глобулина. Не найдено и микробного загрязнения препаратов на всех этапах инкубации.

Эти данные делают наиболее вероятным предположение о том, что мы наблюдаем спонтанное дезамидирование белка в процессе его длительного

Т а б л и ц а 2
Содержание (в % к белку) растворимых в 6% ТХУ
Лоури-положительных соединений в препаратах γ -глобулина при инкубации

	Время инкубации, сут					
	0	15	30	45	60	72
Лоури-положительные соединения <i>P</i>	7,2	7,3 > 0,1	7,9 > 0,1	8,2 > 0,1	9,9 > 0,1	10,9 > 0,1
						%

существования в условиях, приближающихся к физиологическим (0,9 % NaCl, pH 7,2, 37°C).

Робинсон [1] на основании данных литературы обнаружил корреляцию между содержанием амидов в белках и длительностью их полужизни. Полученные нами данные на нативном белке — γ -глобулине сыворотки крови человека — дают возможность предположить, что

спонтанное дезамидирование может быть одной из причин «старения» белковых молекул, в первую очередь дезамидируется аспарагин.

В работе [14] показана меньшая устойчивость дезамидированного цитохрома с. Аналогичные результаты, полученные нами на γ -глобулине, по-

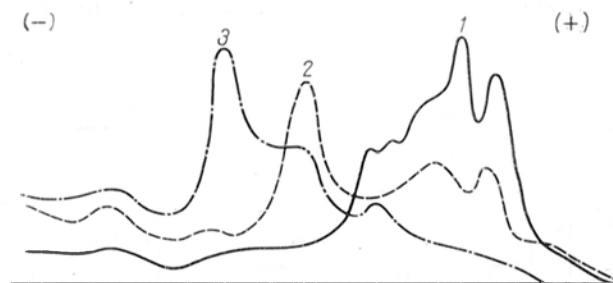


Рис. 2. Электрофоретический спектр γ -глобулина в разные сроки инкубации.
1 — 0 сут; 2 — 45 сут; 3 — 72 сут.

зволяют предположить, что изменение нативной конформации белка при его дезамидировании вследствие модификации электростатических и водородных связей, в которых участвуют амиды и карбоксильные группы, может быть фактором, способствующим устранению «стареющих» белков из сферы биохимических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Robinson A. B., McKerrrow J. H., Cargy P. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1970, v. 66, p. 753.
2. McKerrrow J. H., Robinson A. B. — «Science», 1974, v. 183, p. 85.
3. Robinson A. B., McKerrrow J. H., Legaz M. — «Int. J. Peptid. Protein. Res.», 1974, v. 6, p. 31.
4. Гершеневич З. С., Кричевская А. А., Херувимова В. А. — В кн.: Проблемы нейробиологии. М.—Л., 1966, с. 75.
5. Валеева Г. А., Баев В. И. — «Укр. биохим. ж.», 1974, № 3, с. 33.
6. Папаян А. А. — «Ж. эксперим. и клин. мед.», 1974, № 5, с. 28.
7. Brown R., Duda G., Korkes S. et al. — «Arch. Biochem.», 1957, v. 66, p. 301.
8. Lowry O. H., Roborochuch N. J., Park A. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 173, p. 265.
9. Гершеневич З. С., Кричевская А. А. — «Биохимия», 1960, т. 25, с. 310.
10. Stein W. H., Moor S. — «J. biol. Chem.», 1948,

v. 176, p. 367. — 11. Хаггис Дж., Мили Л., Мюр А. и др. Введение в молекулярную биологию. М., 1967. — 12. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Пушкина Н. В. и др. — «Ж. эволюц. биохим.», 1973, № 2, с. 206. — 13. Кричевская А. А., Пушкина Н. В. — В кн.: Материалы 3-й Северо-Кавказской биохимической конференции. Ростов н/Д., 1976, с. 11. — 14. Flatmark T. — «J. biol. Chem.», 1967, v. 242, p. 2454.

Поступила 10/1 1977 г.

SPONTANEOUS DEAMIDATION OF γ -GLOBULIN

A. A. Krichevskaya, A. I. Lukash, N. V. Pushkina, K. B. Sherstnev

Chair of Biochemistry, State University, Rostov

γ -Globulin from human blood serum was incubated in thermostat at 37° within 15, 30, 45, 60 and 72 days. Amount of readily and poorly hydrolyzed amide groups as well as an increase in amino acid content were estimated in the protein at zero time and at these periods. The sterility of the preparation was examined in each case. Spontaneous deamidation of γ -globulin, observed during incubation, caused an increase in negative charge and altered electrophoretic mobility of the protein molecule. γ -Globulin was attacked by prothelin more effectively as amount of amide groups was decreased in the protein. Spontaneous deamidation appears to be one of reasons of the protein molecules ageing.

УДК 616.153.586.2.01-07:616.831-008.939.53-074

В. Л. Зубер

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБМЕНА ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ФОСФОЛИПИДОВ МОЗГА ПРИ ГИПЕРФЕНИЛАЛАНИНЕМИИ

Лаборатория биохимии нервной системы и обмена веществ Ленинградского университета
им. А. А. Жданова

Исследовано влияние острой и хронической форм гиперфенилаланинемии на содержание и интенсивность обмена отдельных фракций фосфолипидов головного мозга растущих крыс. Острая форма приводила к снижению метаболической активности фосфолипидов, но не влияла на их содержание. Хроническая гиперфенилаланинемия вызывала более резкие изменения в обмене фосфолипидов мозга, что проявлялось в снижении их содержания и интенсивности обмена. Полученные данные позволяют сделать заключение о развитии демиелинизации мозга при хронической гиперфенилаланинемии.

Демиелинизирующие заболевания нервной системы представляют собой одну из актуальных проблем современной неврологии. Этиология и патогенез большинства демиелинизирующих заболеваний остаются пока еще не выясненными. К числу заболеваний, сопровождающихся демиелинизацией, относится фенилкетонурия. Возможности исследования изменений, развивающихся непосредственно в мозговой ткани человека при фенилкетонурии, весьма ограничены. Вследствие этого особую ценность приобретает изучение демиелинизации в экспериментальных условиях при гиперфенилаланинемии, являющейся моделью фенилкетонурии.

Ряд изменений, наблюдаемых при гиперфенилаланинемии у животных — увеличение уровня фенилпировиноградной кислоты в моче и повышение уровня фенилаланина в плазме крови [1—4], снижение уровня серотонина в мозге [5—8], изменения на электроэнцефалограммах [9], снижение способности к обучению [10] — указывает на сходство этой экспериментальной модели с фенилкетонурией у человека. Установлено также, что введение фенилаланина животным в высоких концентрациях приводило к уменьшению массы мозга и снижению содержания и интенсивности обмена галактолипидов и холестерина [11—15]. Количество миелина, выделенного из мозга растущих животных при гиперфенилаланинемии, было на 20—25 % ниже нормы [14, 15], что свидетельствовало о развитии демиелинизирующего процесса. В литературе имеются лишь предварительные данные о влиянии высоких концентраций фенилаланина на содержание и обмен отдельных фракций фосфолипидов мозга [11, 16]. Между тем изучение фосфолипидов при гиперфенила-

ланинемии представляет несомненный интерес, так как они являются необходимыми структурными компонентами миелиновых оболочек, подвергающихся разрушению при различных демиелинизирующих заболеваниях.

Методика

В настоящей работе изучали содержание и интенсивность обмена фосфолипидов головного мозга 20-дневных крысят при острой и хронической формах гиперфенилаланинемии. При острой форме 20-дневным животным вводили фенилаланин подкожно 2 раза в день с интервалом 30 мин из расчета 0,6 мг/100 г массы. В хронических опытах использовали 15-дневных крысят, которым вводили фенилаланин 4 раза в сутки в течение 5 дней, в результате чего каждое животное получало ежедневно 2,4 мг фенилаланина на 1 г массы. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Животных забивали на 5-й день после первого введения фенилаланина в возрасте 20 дней (масса 25—30 г).

Общие липиды выделяли из головного мозга по методу Фолча [17]. Фосфолипиды отделяли от цереброзидов и сульфатидов в системе растворителей хлороформ — метанол — концентрированный аммиак (80 : 20 : 0,4) по методу О'Брайена [18]. После трехкратной элюции в хлороформ-метаноловой смеси (2 : 1) фосфолипиды разделяли на отдельные фракции в системе растворителей хлороформ — метанол — 7 н. аммиак (65 : 35 : 5). Метод тонкослойной хроматографии позволил разделить фосфолипиды мозга на 7 фракций — сфингомиелин, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидная кислота, монофосфоинозитид и кардиолипин. Содержание фосфолипидов определяли по флюоресценции [19]. В качестве радиоактивного предшественника биосинтеза фосфолипидов использовали ацетат-2-¹⁴C (30 мкКи/100 г массы), экспозиция с которым равнялась 1 ч. Радиоактивность фосфолипидов определяли на газопоточном счетчике «Протока». Для каждой фракции определяли удельную радиоактивность (УА) и относительную удельную радиоактивность (ОУА), которую выражали в процентах по отношению к УА гомогената мозга.

Результаты и обсуждение

При острой форме гиперфенилаланинемии не было обнаружено достоверных изменений в содержании исследуемых фракций фосфолипидов. Напротив, многократные инъекции фенилаланина вызывали отчетливое снижение содержания большинства фракций фосфолипидов (табл. 1).

Таблица 1

Содержание фосфолипидов мозга контрольных и подопытных животных при хронической гиперфенилаланинемии

Фракция фосфолипидов	Содержание фосфолипидов			
	мкг Р/г влажной ткани		% к липидному Р	
	контроль (n = 6)	гиперфенилаланинемия (n = 8)	контроль	гиперфенилаланинемия
Сфингомиелин	114,0±5,6	70,6±3,4	7,3	5,6
Фосфатидилсерин	174,0±6,2	111,0±8,1	11,1	8,8
Фосфатидилхолин	628,0±21,0	620,0±15,6	40,0	49,0
Фосфатидилэтаноламин	494,0±13,2	334,0±12,6	31,4	26,5
Монофосфоинозитид	77,0±2,5	70,0±3,0	4,9	5,6
Фосфатидная кислота	39,2±2,4	20,1±1,2	2,5	1,6
Кардиолипин	44,0±1,8	29,2±0,7	2,8	2,0

Количество сфингомиелина и фосфатидилсерина при хронической форме гиперфенилаланинемии уменьшалось на 36 и 38 % соответственно, содержание фосфатидилэтаноламина и кардиолипина снижалось в среднем на 32 %, количество фосфатидной кислоты — на 48 %. Абсолютное содержание монофосфоинозитида и фосфатидилхолина практически не изменялось, хотя их процентное содержание увеличивалось.

Данные о влиянии различных форм гиперфенилаланинемии на интенсивность обмена фосфолипидов представлены в табл. 2.

Из приведенных данных следует, что в головном мозге контрольных и подопытных животных наиболее интенсивно обменивались кардиолипин,

фосфатидная кислота и фосфатидилхолин. Наиболее медленное включение радиоактивной метки наблюдалось во фракции сфингомиелина и фосфатидилсерина. При обеих формах гиперфенилаланинемии обнаружено отчетливое снижение интенсивности обмена большинства фосфолипидных фракций. При многократном введении фенилаланина наиболее сильно снижалась УА сфингомиелина, фосфатидилсерина, фосфатидной кислоты и кардиолипина. При острой и хронической формах гиперфенилаланинемии не обнаружено статистически достоверных изменений в интенсивности обмена фосфа-

Т а б л и ц а 2

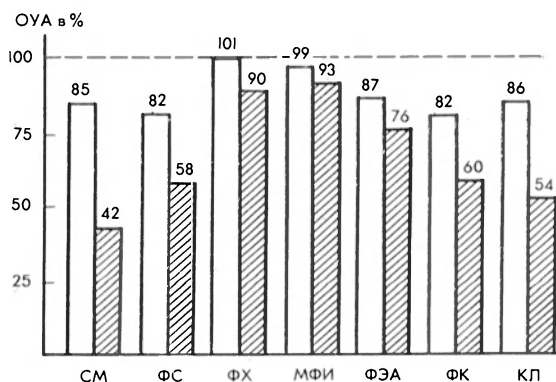
Удельная радиоактивность фосфолипидов мозга при острой и хронической гиперфенилаланинемии

Фракция фосфолипидов	Удельная радиоактивность, имп/мин/мг углерода		
	контроль (n = 10)	острая гиперфенилаланинемия (n = 8)	хроническая гиперфенилаланинемия (n = 8)
Сфингомиелин	251±25	207±21	110±12
Фосфатидилсерин	305±28	240±18	182±14
Фосфатидилхолин	574±49	562±43	540±50
Фосфатидилэтаноламин	368±30	312±21	292±12
Монофосфоинозитид	231±25	247±22	223±18
Фосфатидная кислота	706±68	564±28	435±18
Кардиолипин	913±82	765±60	517±18

тидилхолина и монофосфоинозитида. О снижении обновляемости углеродного скелета фосфолипидов при гиперфенилаланинемии также свидетельствуют данные об их ОУА, представленные на рисунке.

Из приведенных данных следует, что при исследованных формах гиперфенилаланинемии наблюдалось снижение включения радиоактивного углерода в изучаемые фракции фосфолипидов мозга растущих животных. При хронической форме гиперфенилаланинемии эти изменения были более резкими по сравнению с острой формой. Так, если при низких концентрациях фенилаланина в мозге ОУА фосфолипидов снижалась в среднем на 13—18 %, то при высоких концентрациях фенилаланина обмен фосфолипидов уменьшался на 40—50 % по сравнению с контролем. Таким образом, хроническая форма гиперфенилаланинемии является более адекватной моделью фенилкетонурии по сравнению с острой формой. При многократных инъекциях фенилаланина наиболее сильно снижалась обновляемость фосфолипидов, преимущественно локализованных в миелине, — сфингомиелина, фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты. Не было обнаружено статистически достоверных изменений ОУА монофосфоинозитида и фосфатидилхолина.

Таким образом, при хронической форме гиперфенилаланинемии наблюдалось снижение содержания и интенсивности обмена в первую очередь



Относительная удельная радиоактивность фосфолипидов мозга при острой и хронической гиперфенилаланинемии (в % по отношению к контролю).

Светлые столбики — острая гиперфенилаланинемия; заштрихованные — хроническая. СМ — сфингомиелин; ФС — фосфатидилсерин; ФХ — фосфатидилхолин; МФИ — монофосфоинозитид; ФЭА — фосфатидилэтаноламин; ФК — фосфатидная кислота; КЛ — кардиолипин.

так называемых миелиновых фосфолипидов — фосфатидилсерина и сфингомиелина. Этот факт наряду с данными о снижении содержания и интенсивности обмена цереброзидов и сульфатидов при хронической гиперфенилаланинемии [12], уровень которых является показателем миелинизации нервной системы, свидетельствует о том, что при высоких концентрациях фенилаланина в головном мозге растущих животных развивается демиелинизация.

ЛИТЕРАТУРА

1. Huang I., Tannenbaum S., Blume L. et al. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)», 1961, v. 106, p. 133. — 2. Boggs D. E., Polidora V. J., Waismann H. A. — «Fed. Proc.», 1962, v. 21, p. 3. — 3. Polidora V. J., Boggs D. E., Waismann H. A. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)», 1963, v. 113, p. 817. — 4. Karger R., Cahilly G. — «Psychol. Bull.», 1965, v. 64, p. 52. — 5. Louttit R. T. — «Nature», 1958, v. 182, p. 871. — 6. Yuwiler A., Louttit R. T. — «Science», 1961, v. 134, p. 831. — 7. Hsia D. Y.-Y., Nisimura K., Brenchley Y. — «Nature», 1963, v. 200, p. 578. — 8. Wooley D. W., Hoeven T. — «Science», 1963, v. 139, p. 610. — 9. Cadell T. E., Harlow H. F., Waismann H. A. — «Electroenceph. clin. Neurophys.», 1962, v. 14, p. 540. — 10. Perry T. L., Ling G. M., Hausen S. et al. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)», 1965, v. 119, p. 282. — 11. Чаева Л. С., Мухина А. П., Зубер В. Л. — В кн.: Рефераты нужных сообщений 3-го Всесоюзного биохимического съезда. Т. 2. Рига, 1974, с. 154. — 12. Чаева Л. С. — Тезисы научных сообщений 7-й нейрохимической конференции. Л., 1976, с. 216. — 13. Shah S. N., McKean C. M. — «Fed. Proc.», 1968, v. 27, p. 488. — 14. Shah S. N., Peterson N. A., McKean C. M. — «J. Neurochem.», 1970, v. 17, p. 279. — 15. Idem. — Ibid., 1972, v. 19, p. 479. — 16. Зубер В. Л., Носков О. Ф. — Тезисы научных сообщений 7-й нейрохимической конференции. Л., 1976, с. 196. — 17. Folch J. M., Lees M., Sloane Stanley G. H. — «J. Biol. Chem.», 1957, v. 226, p. 497. — 18. O'Brien J. S., Rouser G. J. — «Lipid Res.», 1964, v. 5, p. 339. — 19. Bartlett J. — «J. Biol. Chem.», 1959, v. 234, p. 466.

Поступила 10/1 1977 г.

THE INTENSITY OF METABOLISM OF SOME BRAIN PHOSPHOLIPID FRACTIONS IN HYPERPHENYLALANINEMIA

V. L. Zuber

Laboratory of Nervous System Biochemistry and Metabolism, A. A. Zhdanov State University, Leningrad

Effect of acute and chronic forms of hyperphenylalaninemia on intensity of metabolism and content of some phospholipid fractions was studied in brain of growing rats. Acute form of hyperphenylalaninemia caused a decrease in metabolic activity of phospholipids but did not affect their content. In chronic hyperphenylalaninemia more distinct alterations in brain phospholipids metabolism were manifested as a decrease in their content and in their metabolic intensity. The data obtained suggest that brain demyelination developed in chronic hyperphenylalaninemia.

УДК 615.214.015.45:612.822.

Т. Г. Щеколдина, О. Е. Ватолкина, Р. Е. Либинзон

ВЛИЯНИЕ ПСИХОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦАМФ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям химических соединений, лаборатория биохимии, Купавна Московской области

Изучено действие различных групп психотропных препаратов на активность фосфодиэстеразы цАМФ. Показано, что почти все изученные психотропные средства являются ингибиторами фосфодиэстеразы цАМФ. Наиболее сильное ингибирующее действие оказывают нейролептики — производные фенотиазина и бутирофенона.

Система циклических нуклеотидов является важным фактором регуляции физиологических и биохимических функций. По мнению ряда исследователей, фосфодиэстераза цАМФ может служить важной «мишенью» для многих

лекарственных препаратов [1, 2]. В нашем предыдущем сообщении [3] представлены данные о влиянии сердечно-сосудистых препаратов на фосфодиэстеразу цАМФ мозга. В настоящей работе излагаются данные о влиянии психотропных средств на тот же ферментный препарат.

Методика

Препарат фосфодиэстеразы цАМФ получали из коры головного мозга крысы, как описано ранее [3]. Активность фосфодиэстеразы с низким сродством к субстрату определяли с помощью 5'-нуклеотидазы [3]. Инкубационная среда для определения активности фермента содержала 0.05 М имидазольный буфер, рН 7,6, цАМФ, ферментный препарат, яд среднеазиатской эфы в качестве источника 5'-нуклеотидазы, испытуемые вещества; конечный объем — 2 мл. Инкубацию проводили при 30°C.

В предыдущей статье были представлены данные о зависимости скорости гидролиза цАМФ от времени, концентрации фермента и субстрата [3]. Настоящую работу проводили при следующих условиях: время реакции — 20 мин, содержание белка — 0,2 мг/мл; влияние лекарственных препаратов исследовали при 8 концентрациях в пределах 10^{-7} — 10^{-2} М с использованием концентрации цАМФ 1×10^{-4} М. Эффективность влияния лекарственных препаратов на ферментативную активность фосфодиэстеразы оценивали по величине остаточной активности, выраженной в процентах относительно контрольных проб без лекарств, и значениям I_{50} (концентрация соединения, ингибирующая активность фермента на 50%), которые определяли по кривой ингибирования. Исследования проводили одновременно в 3 параллельных пробах, эксперименты повторяли 3—5 раз.

Результаты и обсуждение

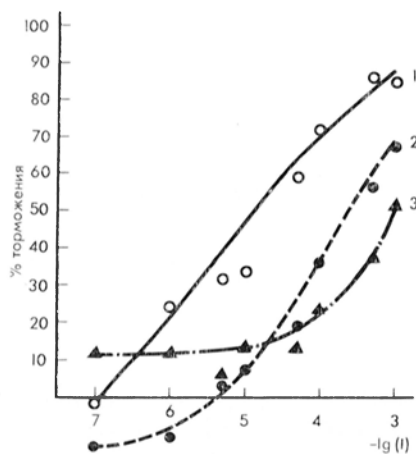
Для исследования влияния лекарственных средств на фосфодиэстеразу цАМФ мозга с низким сродством к субстрату было изучено 17 психотропных препаратов. Все изученные препараты (за исключением ипразида) оказались ингибиторами этого фермента.

Влияние психотропных препаратов на активность фосфодиэстеразы цАМФ (концентрация цАМФ $1,0 \times 10^{-4}$ М)

Препараты	Остаточная активность (в %) при концентрации препарата			I ₅₀ М
	10 ⁻³ М	10 ⁻⁴ М	10 ⁻⁵ М	
I. Нейролептики:				
производные фенотиазина:				
френолон	—	26,7	58,2	1,6×10 ⁻⁵
фторфеназин	15,6	28,1	66,5	1,6×10 ⁻⁵
трифтазин	—	29,6	57,3	1,8×10 ⁻⁵
метеразин	11,6	17,5	56,8	3,2×10 ⁻⁵
аминазин	16,6	42,5	86,3	5,6×10 ⁻⁵
левомепромазин	21,4	70,3	125,3	3,5×10 ⁻⁴
производные бутирофенона:				
галоперидол	31,5	71,4	101,8	3,9×10 ⁻⁴
дроперидол	41,7	73,9	112,7	1,0×10 ⁻⁴
II. Антидепрессанты:				
имизин	13,3	51,3	77,5	2,5×10 ⁻⁴
фторацизин	32,5	64,2	92,1	2,2×10 ⁻⁴
пиразидол	34,5	87,6	99,0	4,5×10 ⁻⁴
азафен	36,3	83,8	110,9	5,6×10 ⁻⁴
ипразид	77,3	87,6	79,4	> 1,0×10 ⁻³
III. Транквилизаторы:				
седуксен	19,8	35,7	93,4	7,1×10 ⁻⁵
амизил	42,6	64,0	83,9	7,9×10 ⁻⁴
IV. Психостимуляторы:				
сиднофен	48,8	76,9	86,3	1,0×10 ⁻³
кофеин	55,5	96,6	100,1	1,3×10 ⁻³

Нейролептики представлены 6 производными фенотиазина и 2 производными бутирофенона. Производные фенотиазина по химическому строению можно разделить на 2 группы: соединения, содержащие при атоме азота фенотиазинового ядра диалкиламиноалкильную цепь (аминазин, левомепромазин); соединения, у которых атом азота боковой цепи является частью ядра пиперазина (френолон, трифтазин, метеразин, фторфеназин).

У препаратов 1-й группы сильнее выражено седативное, у препаратов 2-й группы — антипсихотическое действие [4]. В наших экспериментах лекарственные соединения, относящиеся ко 2-й группе, оказались более сильными ингибиторами (в 2—10 раз), чем фенотиазины 1-й группы (см. таблицу).



Влияние лекарственных соединений на активность фосфодиэстеразы цАМФ.
1 — фторфеназин; 2 — фторацизин; 3 — сиднофен.

Полученные результаты согласуются с литературными данными об аминазе, трифтазине, метеразине и фторфеназине [5—7]. Данных о левомепромазине и френолоне в литературе мы не обнаружили.

Галоперидол и дроперидол — производные бутирофенона — ингибировали фермент в меньшей степени, чем большинство изученных производных фенотиазина.

Все изученные антидепрессанты оказывают менее выраженное ингибирующее влияние на активность фосфодиэстеразы цАМФ, чем нейролептики. Имизин в концентрации 10^{-3} М вызывает 80 % торможение активности фермента, что хорошо согласуется с литературными данными [6].

Сведений об азафене, фторацизине и пиразидоле в литературе мы не нашли. Следует отметить, что антидепрессант пиразидол — новый лекарственный препарат, недавно синтезированный в Советском Союзе [8].

Лекарственные соединения, относящиеся к транквилизаторам (амизил) и психостимуляторам (кофеин, сиднофен), являются относительно слабыми ингибиторами фосфодиэстеразы цАМФ ($I_{50} = 7 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$ М). Производное бензодиазепина — транквилизатор седуксен (диазепам) ингибировал фермент более активно, чем изученные психостимуляторы и амизил.

На рисунке представлена зависимость степени торможения активности фосфодиэстеразы цАМФ от концентрации фторфеназина, фторацизина и сиднофена.

Полученные результаты позволяют предположить, что терапевтический эффект психотропных лекарственных веществ в значительной мере связан с ингибированием фосфодиэстеразы цАМФ и повышением концентрации цАМФ в мозге. Особенно это касается нейролептиков и антидепрессантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sutherland E. W. — «Science», 1972, v. 177, p. 401. — 2. Amer M. S., McKinney G. R. — «Life Sci.», 1973, v. 13, p. 753. — 3. Либнзон Р. Е., Щеколдина Т. Г., Ватолкина О. Е. и др. — «Вопр. мед. химии», 1977, № 4, с. 526. — 4. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М., 1972. — 5. Weingrub I., Chasin M., Free C. A. et al. — «J. pharm. Sci.», 1972, v. 61, p. 1556. — 6. Janies W., Worczak-Dziuba K., Herman Z. S. — «Psychopharmacologia», 1974, v. 37, p. 351. — 7. Honda F., Imamura H. — «Biochem. biophys. Acta», 1969, v. 161, p. 267. — 8. Машковский М. Д., Гринев А. П., Андреева И. Н. и др. — «Хим.-фарм. ж.», 1974, № 3, с. 60.

Поступила 10/1 1977 г.

EFFECT OF PSYCHOTROPIC PREPARATIONS ON THE ACTIVITY OF cAMP PHOSPHODIESTERASE IN BRAIN CORTEX

T. G. Shekoldina, O. E. Vatulkina, R. E. Libinon

Laboratory of Biochemistry, Research Institute for Biological Testing of Chemical Substances, Kupavna, Moscow Region

Effect of various psychotropic preparations on cAMP phosphodiesterase activity was studied. Almost all the psychotropic drugs studied were shown to inhibit the enzymatic activity. Neuroleptics — derivatives of phenothiazine and butyrophenone — caused the strongest inhibitory effect.

УДК 831-006.484-008.939.52

Г. М. Попова

ЦЕРЕБРОЗИДЫ ГЛИОМ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Институт нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко АМН СССР, Москва

Цереброзиды глиом мозга человека содержат значительное количество глюкоцереброзидов, составляющее в среднем около 14% от общего количества цереброзидов. Глюкоцереброзиды обнаружены также в прилежащей к опухоли ткани мозга, но в значительно меньших количествах.

Гликолипиды являются важными пластическими веществами мозга [1—7]. Наряду с фосфолипидами они входят в состав мембран, что представляет особый интерес при исследовании опухолевой ткани, так как неопластическая дегенерация клеток характеризуется изменением их мембран.

В нашей лаборатории в течение ряда лет проводится исследование цереброзидов глиом мозга человека. Целью этих исследований является выяснение сходства и различий в составе цереброзидов мозга и глиом мозга.

Ранее нами было изучено содержание цереброзидов в ткани глиом, а также был обнаружен фермент, расщепляющий цереброзиды [3, 8—10].

Целью данной работы явилось изучение углеводного компонента цереброзидов глиом. При этом представляло интерес выяснить, являются ли все цереброзиды глиом галактоцереброзидами, так как известно, что при некоторых заболеваниях нервной системы, а именно липидозах, в ее ткани появляются цереброзиды, содержащие глюкозу [11].

Методика

В работе были использованы глиальные опухоли мозга человека, полученные во время нейрохирургических операций. В основном рассматривались опухоли астроцитарного ряда. Кроме того, исследовалась ткань мозга больных, не имевших опухоли, полученная на секции.

Ткань опухоли тщательно очищали от крови. Цереброзиды экстрагировали последовательно ацетоном, эфиром, смесью хлороформа с метанолом в соотношении 2 : 1, как было описано ранее [3]. Для освобождения от водорастворимых липидов экстракт дважды промывали 0,1% водным раствором CaCl_2 . Выделенные цереброзиды гидролизовали 3 н. H_2SO_4 и определяли содержание в гидролизате по углеводному компоненту цветной реакцией с орцином [13]. Таким образом было определено общее количество цереброзидов, которое выражали в мг на 1 г влажной ткани.

Глюкоцереброзиды определяли в нейтрализованных гидролизатах цереброзидов по глюкозе специфическим ферментативным методом с глюкозооксидазой [14] и выражали в мг на 1 г ткани, а также в % от общего количества цереброзидов. Для определения возможных примесей ганглиозидов использовали метод определения ганглиозидов по N-ацетилнейраминной кислоте с резорцином [15].

Результаты и обсуждение

Известно, что цереброзиды нормального мозга являются галактоцереброзидами. Однако в последние годы появились данные об обнаружении в ткани мозга небольших количеств глюкоцереброзидов [16—18].

В настоящей работе, прежде чем исследовать цереброзиды глиом, мы изучили содержание цереброзидов в ткани мозга человека, составившее в белом веществе $32,8 \pm 0,98$ ($n = 6$), а в сером веществе — $7,15 \pm 0,29$ ($n = 7$) мг/г влажной ткани. Эти данные согласуются с полученными нами ранее, а также с данными других авторов [8, 19, 20]. Глюкоцереброзиды не были нами найдены ни в белом, ни в сером веществе.

Результаты изучения цереброзидов глиом мозга человека приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Цереброзиды глиом		
Исследуемый показатель	Мг/г влажной ткани	% от общего количества цереброзидов
Цереброзиды (общее количество)	$1,76 \pm 0,16$ (14)	100
Глюкоцереброзиды	$0,217 \pm 0,02$ (14)	$13,7 \pm 1,37$

П р и м е ч а н и е. В скобках — количество случаев.

Как видно из табл. 1, общее содержание цереброзидов в глиомах значительно ниже, чем в ткани мозга. Это было показано нами ранее и согласуется с данными других авторов [1, 4].

Из табл. 1 видно также, что цереброзиды глиом содержат значительное количество глюкоцереброзидов, составляющее в среднем около 14 % от общего количества цереброзидов, в то время как в ткани мозга глюкоцеребро-

зиды отсутствуют. В отдельных случаях количество глюкоцереброзидов в глиомах достигало 22 % от общего количества цереброзидов.

Для того чтобы убедиться, что определяемая нами глюкоза не обусловлена возможным присутствием в исследуемых пробах других гликолипидов, мы проводили контроль на ганглиозиды, которые определяли, как было указано выше, резорциновым методом [15]. Однако ганглиозиды не были нами обнаружены.

Результаты исследования содержания цереброзидов в ткани опухоли и прилежащей к ней ткани мозга приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, глюкоцереброзиды присутствуют не только в опухолевой ткани, но обнаруживаются и в ткани мозга, прилежащей к опухоли, однако в количествах, менее значительных. Таким образом, изменения в составе цереброзидов, характерные для опухолевой ткани, имеются уже и в прилежащей к опухоли ткани мозга.

Возможно, что определяемая нами фракция глюкоцереброзидов включает также и некоторое количество дигексозилцерамидов, которые были найдены Лоу и соавт. в опухолях мозга [21], а Свеннерхольмом в ткани эмбрионального мозга [22].

Т а б л и ц а 2

Цереброзиды глиальных опухолей мозга и прилежащей к ним ткани мозга человека

Ткань	Общее количество цереброзидов, мг/г влажной ткани	Глюкоцереброзиды	
		мг/г влажной ткани	% от общего количества цереброзидов
Опухоль	1,76	0,200	11,0
»	1,42	0,207	14,0
Мозг	5,53	0,086	1,6
Опухоль	2,88	0,202	7,1
»	2,82	0,202	7,1
Мозг	14,80	0,459	3,1
Опухоль	1,34	0,206	15,3
»	1,50	0,163	10,8
Мозг	5,86	0,138	2,3
Опухоль	1,21	0,165	13,7
»	0,72	0,153	21,1
Мозг	10,20	0,268	2,6
Опухоль	1,05	0,202	19,2
»	1,00	0,158	15,7
Мозг	2,27	0,078	3,6

Присутствие в ткани глиом цереброзидов, содержащих в качестве углеводного компонента не галактозу, как в ткани мозга, а глюкозу, представляет определенный интерес и дает основание для ряда предположений.

Во-первых, появление глюкоцереброзидов может быть связано с нарушением механизмов биосинтеза цереброзидов в ткани глиом. Возможно, что в ткани глиом может происходить синтез цереброзидов не только из галактозы, как в ткани нормального мозга, но также и из глюкозы, которая, как известно, с большой скоростью потребляется тканью опухоли [23].

Кроме того, как уже было отмечено, глюкоцереброзиды найдены в ткани эмбрионального мозга [22], а Хоши, Вильямс и Кишимото обнаружили значительное количество глюкоцереброзидов в мозге крыс в раннем постнатальном периоде развития, предшествующем миелинизации [24]. С увеличением возраста животного количество глюкоцереброзидов уменьшалось, а галактоцереброзидов увеличивалось. Глюкоцереброзиды также были найдены Абе и Нортон в мозге 15—20-дневных крыс [25]. Анализ полученных нами результатов и сопоставление их с данными литературы позволяют высказать предположение, что глюкоцереброзиды могут быть характерными компонентами растущей нервной ткани — как нормально развивающегося мозга, так и глиальной опухоли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Slagel D. E., Dittmer J. C., Wilson C. B. — *J. Neurochem.*, 1967, v. 14, p. 719. — 2. Paoletty E. G., Paoletty P. — In: Kirsch W. H., Paoletty G., Paoletty P. (Eds). *The Experimental Biology of Brain Tumors*. Springfield, 1971, p. 298. — 3. Попова Г. М., Промыслов М. III. — *Бюлл. exper. биол.*, 1962, № 6, с. 71. — 4. Промыслов М. III. — В кн.: *Проблемы нейрохимии*. М.—Л., 1966, с. 118. — 5. Clausen J. — In: Walaas O. (Ed.) *Molecular Basis of Some Aspects of Mental Activity*. v. 1. New York, 1966, p. 181. — 6. Low H. C., Clausen J., Bierring F. — *J. Neurochem.*, 1968, v. 15, p. 263. — 7. Прохорова М. J., Туманова S. Y., Тчаика Т. V. — *Neuropatol. pol.*, 1972, v. 10, № 2. — 8. Попова Г. М., Промыслов М. III. — *Укр. биохим. ж.*, 1970, т. 42, 472. — 9. Они же. — Там же. 1965, т. 37, с. 546. — 10. Попова Г. М. — *Биохимия*, 1968, т. 33, с. 1279. — 11. Cumings J. N. (Ed.) *Modern Scientific Aspects of Neurology*. London, 1960, p. 330. — 12. Maloney R. F. J., Cumings J. N. — *J. Neurol. Neurosurg., Psychiat.*, 1960, v. 25, p. 207. — 13. Svennerholm L. — *J. Neurochem.*, 1956, v. 1, p. 42. — 14. Городецкий В. К. — В кн.: *Современные методы в биохимии*. Т. I. М., 1964, с. 311. — 15. Svennerholm L. — *Biochim. biophys. Acta*, 1957, v. 24, p. 604. — 16. Tama Y., Yamakawa T. — *Jap. J. exp. Med.*, 1968, v. 38, p. 143. — 17. Nishimura K., Yamakawa T. — *Lipids*, 1968, v. 3, p. 262. — 18. Hammerström S. — *Europ. J. Biochem.*, 1971, v. 21, p. 388. — 19. Radin N. S., Akahori J. — *J. Lipid Res.*, 1961, v. 2, p. 355. — 20. Bernhard K., Hany A., Hauscher L. et al. — *Helv. chim. Acta*, 1962, v. 45, p. 1298. — 21. Lou H. O. Ch., Clausen J., Bierring F. — *J. Neurochem.*, 1965, v. 12, p. 619. — 22. Svennerholm L. — *Ibid.*, 1964, v. 11, p. 839. — 23. Шапот В. С. *Биохимические аспекты опухолевого роста*. М., 1975. — 24. Hoshi M., Williams M., Kishimoto J. — *J. Neurochem.*, 1973, v. 21, p. 709. — 25. Abe T., Norton W. T. — *Ibid.*, 1974, v. 23, p. 1025.

Поступила 10/1 1977 г.

CEREBROSIDES OF HUMAN BRAIN GLIOMAS

G. M. Popova

N. N. Burdenko Institute of Neurosurgery, Academy of Medical Sciences of the USSR,
Moscow

Cerebrosides of human brain gliomas contained much glucocerebrosides, which constituted about 14% of the total cerebrosides content. Glucocerebrosides were also found in tissue, adjoining to brain tumor, but in significantly low amounts.

Л. В. Тесленко, М. С. Усатенко

АКТИВНОСТЬ ВАЛИЛ- И АЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КРОЛИКА ПРИ ДИАБЕТЕ И ВВЕДЕНИИ В ОРГАНИЗМ ИНСУЛИНА

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины АМН СССР, Институт
усовершенствования врачей, Ленинград

Активность аланил-тРНК-синтетазы и валил-тРНК-синтетазы в камбаловидной мышце кролика значительно выше, чем в икроножной. Многократное введение нормальным животным инсулина или развитие у них в течение 2 нед аллоксанового диабета не приводило к достоверным изменениям активности этих ферментов в обоих типах мышц.

Важным этапом биосинтеза белка является присоединение аминокислот к транспортным РНК, катализируемое аминоксил-тРНК-синтетазами (АРС-азами). В печени инсулин стимулирует синтез белка и повышает активность АРС-аз [1, 2], при диабете происходят противоположно направленные изменения [3, 4]. В скелетных мышцах, как и в печени, введение инсулина вызывает повышение синтеза белка; диабет снижает скорость включения аминокислот в мышечные белки [5, 6]. Вопрос о влиянии инсулина на активность АРС-аз в скелетных мышцах изучен недостаточно. В красных мышечных волокнах синтез белков протекает интенсивнее, чем в белых [7]. Исследование соотношения активностей АРС-аз в разных типах мышц и влияния гормонов на активность этих ферментов имеет существенное значение для выяснения участия АРС-аз в гормональной регуляции синтеза белка в мышечных клетках.

В настоящей работе исследована активность валил-тРНК-синтетазы (КФ 6.1.1.9) и аланил-тРНК-синтетазы (КФ 6.1.1.7) в интактной камбаловидной (красной) и икроножной (смешанной, с преобладанием белых волокон) мышцах кролика. Наряду с этим определена активность АРС-аз в обеих мышцах при аллоксановом диабете и введении нормальным кроликам инсулина.

М е т о д и к а

В опытах были использованы кролики-самцы массой 2,5—3,0 кг. Протамин-цинк-инсулин (Минский завод эндокринных препаратов) вводили внутримышечно в течение 5 дней 2 раза в сутки по 5 ЕД на 1,0 кг массы тела. За 90 мин до забоя животного ему вводили инсулин (завод медицинских препаратов Ленинградского мясокомбината) из расчета 5 ЕД на 1,0 кг массы тела. Диабет вызывали однократной внутривенной инъекцией 120 мг аллоксана (фирма «Calbiochem») на 1,0 кг массы тела. На 12-е сутки после введения аллоксана кроликов декапировали. В опыт брали животных с концентрацией глюкозы в крови 400 мг% и выше. Концентрацию глюкозы определяли ортотолуидиновым методом [8]. Измельченные мышцы гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы. Растворимую фракцию цитоплазмы получали последовательным центрифугированием гомогената при 12 000 g в течение 20 мин и при 105 000 g в течение 90 мин. В надосадочной жидкости определяли содержание белка микробиуретовым методом [9] и активность АРС-аз по скорости присоединения меченых аминокислот к тРНК. В состав инкубационной смеси для определения активности валил-тРНК-синтетазы [10] добавляли 0,5 мМ $1-^{14}\text{C}$ -валина, а также 300 мкг нефракционированной дрожжевой тРНК, полученной из Новосибирского института органической химии Сибирского отделения АН СССР, или 200 мкг нефракционированной животной тРНК, выделенной из печени быка по методу Брунграбера [11]. Условия определения активности аланил-РС-азы были аналогичными, за исключением того, что вместо валина в среду добавляли 0,5 мМ $1-^{14}\text{C}$ -аланина, 400 мкг дрожжевой или 500 мкг бычьей тРНК. Отдельные образцы как животной, так и дрожжевой нефракционированной (суммарной) тРНК несколько отличаются друг от друга по акцепторной активности, поэтому при анализе результатов исследования сравнивали только такие серии опытов, которые проводили с использованием одного и того же препарата тРНК. Реакцию останавливали добавлением 5 мл 5% холодной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В холостые пробы ТХУ добавляли до прибавления раствора фермента, запускающего реакцию. Радиоактивность осадка, собранного на миллипоровые фильтры и промытого 50 мл 5% ТХУ, измеряли на сцинтилляционном счетчике фирмы «Nuclear Chicago» (США). Активность фермента выражали в импульсах в минуту на 1 мкг тРНК на 1 мкг белка при 30 мин инкубации.

Результаты и обсуждение

Скелетные мышцы состоят из двух типов мышечных волокон — красных и белых, различающихся по физиологическим, биохимическим и гистологическим характеристикам [12, 13]. Камбаловидную мышцу (*m. soleus*) по ее строению и функциям относят к красным, медленным, мышцам, а икроножную (*m. gastrocnemius*), состоящую из двух частей (*gastrocnemius lateralis*), содержащую преимущественно белые волокна, и *gastrocnemius*

Активность АРС-аз в мышцах кролика при диабете и введении в организм инсулина
($M \pm m$)

Акцептируемая аминокислота	Мышца	Активность АРС-аз, имп/мин/мг тРНК/мг белка	
		дрожжевая тРНК	тРНК бычьей печени
1- ¹⁴ C-аланин	Камбаловидная:		
	контроль	855±53	822±74
	диабет	868±60	746±46
	контроль	739±56	736±48
	инсулин	712±47	704±63
	Икроножная:		
	контроль	408±39	482±49
	диабет	426±55	473±47
1- ¹⁴ C-валин	контроль	422±39	546±43
	инсулин	472±38	646±52
	Камбаловидная:		
	контроль	1145±48	663±31
	диабет	1154±52	584±36
	контроль	1176±71	703±65
	инсулин	1249±95	684±57
	Икроножная:		
	контроль	662±39	396±30
	диабет	615±30	379±38
	контроль	623±58	496±50
	инсулин	619±59	629±65

medialis, в которой имеется незначительное преобладание красных волокон относят к мышцам смешанного, быстрого, типа. В наших опытах использовались *m. soleus* и латеральная часть *gastrocnemius*.

Как видно из таблицы, активность обеих АРС-аз в интактной камбаловидной мышце выше, чем в икроножной (при использовании как дрожжевой, так и бычьей тРНК), что соответствует данным Шорта и Голдберга [7, 14] о более высоком уровне включения меченых аминокислот в белки красных мышц по сравнению с белыми.

При добавлении в инкубационную смесь дрожжевой тРНК активность валил-РС-азы выше активности аланил-РС-азы на 34% в камбаловидной мышце и на 62% в икроножной. При использовании бычьей тРНК в качестве акцептора аминокислот соотношения между активностями АРС-аз в обеих интактных мышцах были обратными: аланил-РС-аза оказалась активнее валил-РС-азы. Это, по-видимому, связано с тем, что изоакцепторный состав специфичных к аланину и валину тРНК, выделенных из разных источников, различен [15].

Достоверных изменений активности аланил-РС-азы и валил-РС-азы в обеих мышцах при диабете и введении нормальным животным инсулина по сравнению с АРС-азами контрольной группы животных не наблюдалось.

Вул и соавт. [16] нашли, что диабет приводит к суммарному снижению (на 20%) активности АРС-аз в скелетных мышцах крыс при измерении аминокислотирования тРНК в системе, содержащей 15 аминокислот. Авторы предполагают, что сниженное образование аминокислот-тРНК ферментами из мышц диабетического животного с диабетом обусловлено торможением активности одной или нескольких АРС-аз. Важно отметить, что диабет вы-

зывает разнонаправленные изменения концентраций отдельных аминокислот при суммарном снижении их содержания в мышцах. Концентрация ряда аминокислот (7 из 15 исследованных) в клетках мышц снижается, тогда как концентрация аланина не изменяется, а валина даже несколько возрастает [16].

В наших прежних исследованиях [17] было установлено, что через 30 дней после денервации мышц кролика активность аланил- и валил-РС-аз в камбаловидной мышце резко снижается, а в икроножной возрастает, в результате чего исчезают различия в величинах активности этих АРС-аз между разными типами денервированных мышц.

Таким образом, активность аланил-РС-азы и валил-РС-азы коррелирует с интенсивностью синтеза белка в интактных и денервированных разноспециализированных мышечных клетках. Однако эти ферменты не участвуют в реализации регулирующего действия инсулина на синтез белка в скелетных мышцах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Doell R. G. — «Biochim. biophys. Acta», 1960, v. 30, p. 237. — 2. Гарманиук Я. Л., МIRONENKO В. И., Холявко П. М. — «Пробл. эндокринолог.», 1970, № 5, с. 57. — 3. Marsh B. — «Am. J. Physiol.», 1961, v. 201, p. 55. — 4. Germanyuk Y. L., MIRONENKO V. I. — «Nature», 1969, v. 222, p. 486. — 5. Wool I. G., KRAHL M. E. — «Am. J. Physiol.», 1959, v. 197, p. 367. — 6. PAIN V. M., GARLICK P. I. — «J. biol. Chem.», 1974, v. 249, p. 4510. — 7. Short F. A. — «Am. J. Physiol.», 1969, v. 217, p. 307. — 8. Zender R. — «Clin. chim. Acta», 1963, v. 8, p. 351. — 9. Itzhaki R. V., GILL D. M. — «Analyt. Biochem.», 1964, v. 8, p. 401. — 10. Мацука Г. Х., Сквирська Е. Б., Бабий Т. П. и др. — «Укр. биохим. ж.», 1968, № 2, с. 115. — 11. Brunngraber E. F. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1962, v. 8, p. 1. — 12. Beatty C. H., Peterson R. D., BOSEK R. M. — «Am. J. Physiol.», 1963, v. 204, p. 939. — 13. Stein I. M., ПАДЬКОВА Н. А. — «Am. J. Anat.», 1962, v. 110, p. 103. — 14. Goldberg A. L. — «Nature», 1967, v. 216, p. 1219. — 15. Фаворова О. О., Фролова Л. Ю., Харатьян С. Г. и др. — «Молекулярная биол.», 1968, № 3, с. 455. — 16. Wool I. G., Stirewalt W. S., Kurihara K. et al. — «Recent Progr. Hormone Res.», 1968, v. 24, p. 139. — 17. Тесленко Л. В., Усатенко М. С., Ильин В. С. — «Ж. эволюц. биохим.», 1976, № 5, с. 399.

Поступила 31/1 1977 г.

THE ACTIVITY OF VALYL- AND ALANYL tRNA SYNTHETASES IN SKELETAL MUSCLES OF DIABETIC AND INSULIN TREATED RABBITS

L. V. Teslenko, M. S. Usatenko

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute for Post-Graduate Training of Physicians, Leningrad.

Activities of alanyl- and valyl tRNA synthetases were considerably higher in rabbit muscle soleus than in muscle gastrocnemius. Repeated injections of insulin into normal rabbits as well as impairment of animals by experimental alloxan diabetes within two weeks did not alter significantly the activity of the synthetases in red and mixed muscles.

УДК 612.822.1:547.953

М. А. Флеров

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И МЕТАБОЛИЗМ ФОСФОЛИПИДОВ НЕЙРОНОВ И НЕЙРОГЛИИ

Лаборатория биохимии нервной системы Физиологического института, Ленинградский университет им. А. А. Жданова

Исследовали процентное распределение и интенсивность обмена отдельных фракций фосфолипидов в нейронах и нейроглии, выделенных из коры головного мозга методом дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы и фикоλλα со степенью обогащения 90 и 80% соответственно. Для нейронов характерно более высокое процентное содержание монофосфоинозитидов и лизофосфатидилхолинов по сравнению

с нейроглией. В нейроглии выше содержание фосфатидных кислот и сфингомиелинов. Наибольшей удельной радиоактивностью при введении ацетата- ^{214}C как в нейронах, так и в нейроглии обладают фосфатидные кислоты. Для нейронов характерен более высокий уровень обмена отдельных фракций фосфолипидов.

Выяснение молекулярных механизмов функциональной деятельности нейронов, а также их метаболической взаимосвязи с нейроглией является одной из актуальных проблем современной нейробиологии. Более углубленное изучение биохимических процессов, происходящих в нейронах и нейроглии, позволит приблизиться к пониманию не только нейробиологических механизмов деятельности головного мозга, но и даст возможность направленно применять фармакологические препараты при неврологических заболеваниях, вызванных нарушениями метаболизма в системе нейрон — нейроглия. Особое место в этих исследованиях занимает изучение метаболизма мембранных липидов нервных и глиальных клеток. Как известно, одним из важнейших компонентов биологических мембран являются фосфолипиды, которые участвуют не только в структурной организации последних, но и являются естественными регуляторами тончайших биохимических процессов, происходящих в нервных клетках [1]. Имеющиеся в литературе данные о количественном содержании и метаболизме фосфолипидов в нейронах и нейроглии немногочисленны и противоречивы [2—11]. Следует отметить, что исследования метаболизма отдельных фракций фосфолипидов выполнены в основном в опытах *in vitro* или на культурах клеток, за исключением работ [3, 11], где авторы применили ^{32}P в качестве радиоактивного предшественника фосфолипидов.

В настоящей работе представлены данные о процентном распределении и интенсивности обмена отдельных фракций фосфолипидов в нейронах и нейроглии, выделенных из коры головного мозга методом препаративного ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы и фиколла.

Методика

В основу выделения обогащенных нейронами и нейроглией фракций был положен метод Селлиджера [12] в нашей модификации. Модификация была предпринята с целью получения большего количества нейронального материала, а также большей степени очистки нейроглии. Для получения нейронов и нейроглии в количестве, необходимом для выделения фосфолипидов, исследования их состава и метаболизма брали около 3 г коры головного мозга.

Опыты ставили на белых крысах-самцах весом 120—140 г, которым подкожно вводили сроком на 1 ч ацетат- ^{214}C . Крыс декапитировали и быстро извлеченный мозг помещали на предварительно охлажденные стеклянные пластинки. Освобожденную от белого вещества кору мелко измельчали и помещали на 15 мин в раствор, содержащий 7,5% поливинилпирролидона (ПВП), 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 10 мМ CaCl_2 . Обработанную таким образом ткань пропускали последовательно трижды через нейлоновые сита с размером отверстий 258 и 82 мк, а затем через металлическое сито — 58 мк. Полученную после пропускания через сита клеточную суспензию наслаивали на градиент, содержащий 6 мл 1,0 М сахарозы над 5 мл 1,75 М сахарозы. Растворы сахарозы готовили на 1% БСА. Центрифугирование проводили в течение 30 мин при 20 000 об/мин в ультрацентрифуге VAC-60, используя ротор SWOUT 50×3. В результате центрифугирования получали 2 слоя и осадок. Верхний слой на 1,0 М сахарозе представляет собой остатки миелиновых оболочек, второй слой на 1,75 М сахарозе состоит из большого количества глиальных и нейрональных клеток, а также капилляров. Осадок представлен телами нейронов, количество которых незначительно и не позволяет проводить хроматографическое и изотопное исследование фосфолипидов. Слой, содержащий нейроглию, нейроны и капилляры, собирали с помощью пастеровской пипетки, суспендировали в среде, содержащей 7,5% ПВП, 5% фиколла, 1% БСА, пропускали дважды через металлическое сито 58 мк и наслаивали на градиент, содержащий 3 мл 30% фиколла, 6 мл 1,2 М сахарозы и 5 мл 1,65 М сахарозы. Пробы центрифугировали при 20 000 об/мин в течение 30 мин. В результате центрифугирования получили 2 слоя и осадок. Верхний слой на 30% фиколле представляет собой миелин, слой на 1,65 М сахарозе содержит значительные количества нейроглии с примесями нейронов и капилляров — это так называемая сырая фракция нейроглии. Осадок, содержащий значительное количество тел нейронов с примесями глии и капилляров, подвергали дальнейшей очистке. Для этого его суспендировали в 0,25 М сахарозе, фильтровали через металлическое сито 58 мк и наслаивали на градиент, состоящий из 6,0 мл 1,0 М сахарозы и 5 мл 1,75 М сахарозы. После центрифугирования в течение 30 мин при 20 000 об/мин получен осадок, содержащий

90% тел нейронов и слой на 1,75 М сахарозе, который преимущественно состоял из капилляров и глиальных клеток. Полученный осадок нейрональных тел объединяли с нейронами, полученными после первого центрифугирования. «Сырая» глиальная фракция, содержащая до 60% глиальных клеток, также подвергалась дальнейшей очистке. После суспендирования в 10% фиколле и фильтрования через металлическое сито 58 мк «сырую» глиальную фракцию наносили на градиент, состоящий из 30% фиколла и 1,5 М сахарозы. Пробы центрифугировали 90 мин при 25 000 об/мин. В результате центрифугирования получали слой на 1,5 М сахарозе, который содержал 80% нейроглиальных клеток и незначительный осадок, состоящий из нейронов и капилляров. Схема выделения и очистки нейронов и нейроглии из коры головного мозга представлена на рис. 1. После выделения фракции нейронов и нейроглии отмывали от сахарозы физиологическим раство-

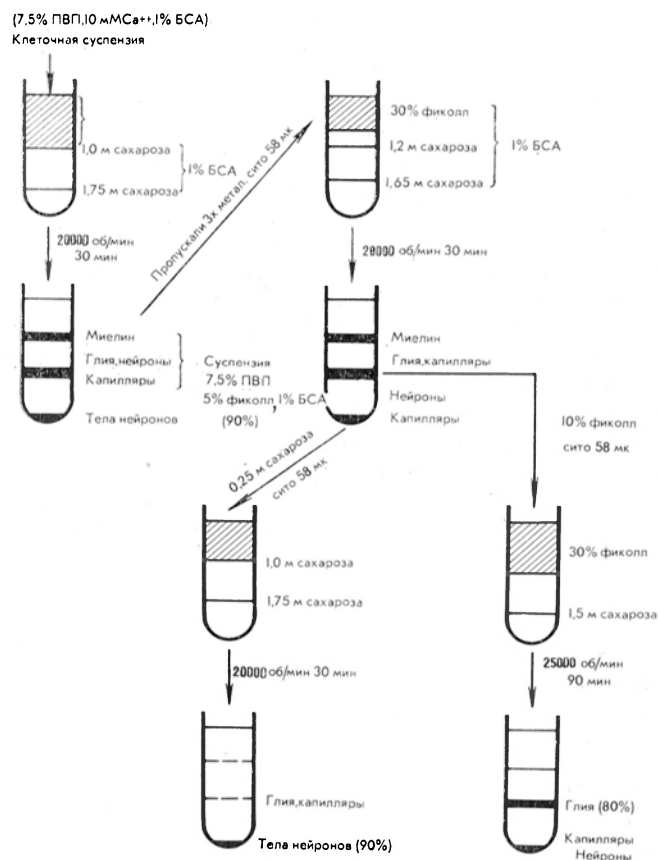


Рис. 1. Схема препаративного выделения нейронов и нейроглии из коры головного мозга методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы и фиколла.

ром и отбирали аликвоты для определения белка по методу Лоури [13]. Большая часть полученных фракций оставлялась для экстракции липидов [14]. После выделения липидов проводили разделение фосфолипидов на отдельные фракции методом двухмерной тонкослойной хроматографии [15]. Хроматографирование проводили, используя в качестве адсорбента силикагель, нанесенный на пластинки размером 20×20 см с толщиной слоя 0,5—0,6 мм. На предварительно активированные в течение 1 ч при 105—110° пластинки наносили аликвоту липидного экстракта в хлороформ—метаноле (2:1), содержащую 40—60 мкг липидного фосфора. Пластинки помещали в хроматографическую камеру с системой растворителей хлороформ — метанол — 7 н. NH_4OH (12 : 7 : 1). По прохождении фронта растворителей на расстояние 17—18 см пластинку вынимали, сушили в течение 10—15 мин при пониженном давлении, поворачивали на 90° и помещали в камеру с системой растворителей хлороформ — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (80 : 40 : 7,4 : 1,2). Разделение вели параллельно на 2 пластинках. Идентификацию отдельных фракций фосфолипидов проводили методом инфракрасной спектроскопии [16].

После проявления в парах йода пятна, соответствующие фракциям фосфолипидов, собирали с одной пластинки для количественного определения, а со второй — в сосуды для

подсчета радиоактивности. Сжигание фосфолипидов до неорганического фосфора проводили в 0,7 мл 72% хлорной кислоты при 200° в течение 40 мин. В охлажденные пробы добавляли до 4 мл H₂O и после центрифугирования определяли фосфор фосфолипидных фракций по методу Бартлетта [7]. Радиоактивность подсчитывали на сцинтилляционном счетчике СБС-1 в толуольном сцинтилляторе, содержащем 4 г 2,5-дифенилоксазола и 300 мг 1,4-ди-(5-фенил-2-оксазолбензола) в 1 л толуола.

Результаты и обсуждение

Полученные методом дифференциального ультрацентрифугирования обогащенные фракции подвергали микроскопическому контролю. При этом оказалось, что нейрональная фракция очищена на 90 %, а нейроглиальная — на 80 %. Нейрональная фракция представлена телами нейронов с частично

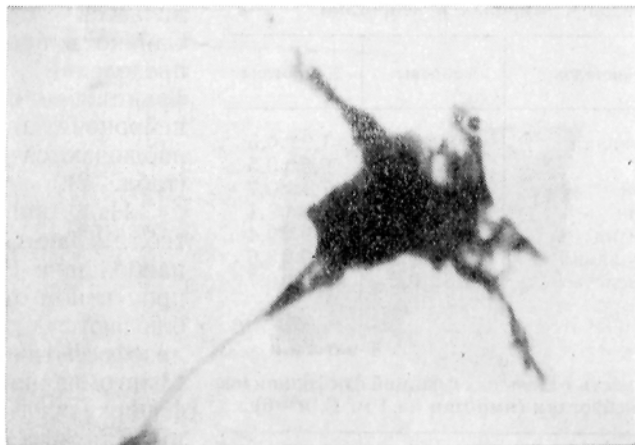


Рис. 2. Нейрон с частично сохранившимися отростками.
Микрофотография после окраски крезиловым фиолетовым. Ув. $\times 1350$.

сохранившимися отростками (рис. 2). Данные электронно-микроскопического исследования позволяют заключить, что мембраны как в нейрональной, так и в нейроглиальной фракции хорошо сохранены. Это особенно важно при изучении метаболизма мембранных компонентов, так как различия в обмене могут быть обусловлены разной степенью повреждения клеточных мембран.

В табл. 1 представлены данные о выходе нейронального и нейроглиального белка, а также о содержании общих липидов и фосфолипидов.

Т а б л и ц а 1

Выход белка, содержание общих липидов и фосфолипидов в нейронах и нейроглии

Исследуемый показатель	Нейроны	Нейроглия
Белок, мг/г коры	$2,4 \pm 0,2$	$22,8 \pm 1,6$
Общие липиды, мг/мг белка	$0,27 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,02$
Фосфолипиды, мкг Р/мг белка	$7,1 \pm 0,6$	$13,9 \pm 1,5$
Фосфолипиды, % от общих липидов	$61,0 \pm 5,0$	$69,0 \pm 8,0$

Как видно, примененная нами схема выделения и очистки нейронов и нейроглии позволила получить из 1 г коры головного мозга в среднем $2,4 \pm 0,2$ мг нейронального и $22,8 \pm 1,6$ мг нейроглиального белка. Исходя из содержания белка в одной клетке, которое в среднем равно в нейронах 100 пг на клетку, а в нейроглии — 307 пг на клетку, а также учитывая сте-

пень обогащения нейрональной и нейроглиальной фракций, полученных методом ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы и фиколла [18], можно рассчитать количество выделенных клеток. По нашим данным, это количество для нейронов колеблется в пределах $2,2 \times 10^7$, а для нейроглии — $5,9 \times 10^7$.

Содержание липидов в нейроглии выше, чем в нейронах, более чем в $1\frac{1}{2}$ раза; то же самое можно сказать и о содержании фосфолипидов. Если в нейронах содержание липидного фосфора колеблется в пределах $7,1 \pm 0,6$ мкг/мг белка, то в нейроглии оно составляет $13,9 \pm 1,5$ мкг/мг белка, что почти в 2 раза выше, чем в нейронах. В то же время процентное содержа-

Т а б л и ц а 2

Процентное распределение отдельных фракций фосфолипидов в нейронах и нейроглии

Фракция фосфолипидов	Нейроны	Нейроглия
Лизофосфатидилхолин	$3,9 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,5$
Сфингомиелин	$6,7 \pm 0,6$	$9,5 \pm 0,5$
Фосфатидилсерин	$9,1 \pm 1,7$	$7,1 \pm 0,7$
Фосфатидилхолин	$46,1 \pm 2,1$	$46,9 \pm 2,1$
Монофосфоинозитид	$7,7 \pm 1,0$	$5,9 \pm 0,4$
Фосфатидилэтанолламин	$25,1 \pm 2,9$	$24,9 \pm 3,6$
Фосфатидиновые кислоты	$1,8 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,7$

Т а б л и ц а 3

Удельная активность отдельных фракций фосфолипидов нейронов и нейроглии (имп/мин на 1 мг С, $n=6$)

Фракция фосфолипидов	Нейроны	Нейроглия
Лизофосфатидилхолин	1060 ± 221	492 ± 117
Сфингомиелин	613 ± 34	372 ± 120
Фосфатидилсерин	719 ± 274	326 ± 23
Фосфатидилхолин	747 ± 106	640 ± 153
Монофосфоинозитид	902 ± 69	414 ± 98
Фосфатидилэтанолламин	682 ± 69	157 ± 25
Фосфатидиновые кислоты	2313 ± 722	1208 ± 96

ние фосфолипидов по отношению к общим липидам в нейронах и нейроглии различается незначительно. Однако в процентном распределении отдельных фракций фосфолипидов нейронов и нейроглии наблюдаются отличия (табл. 2).

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что наибольшие различия в процентном отношении наблюдаются для фракций лизофосфатидилхолинов, сфингомиелинов, монофосфоинозитидов и фосфатидиновых кислот. Несмотря на противоречивость данных о процентном распределении фракций фосфолипидов в нейронах и нейроглии [2, 4, 5], что, по-видимому, во многом определяется различиями в методах выделения и очистки нейронов и нейроглии и в методах анализа фосфолипидов, можно отметить,

что для нейронов характерен более высокий процент монофосфоинозитидов и лизофосфатидилхолинов по сравнению с нейроглией, а для нейроглии — более высокое содержание сфингомиелинов и фосфатидиновых кислот. Более высокое содержание монофосфоинозитидов отмечено в нейронах не только крыс, но и голубей, череных и кроликов [4, 19].

Несомненный интерес представляет исследование особенностей метаболизма фосфолипидов в нейронах и нейроглии, так как именно такой подход позволит приблизиться к пониманию роли отдельных фракций фосфолипидов в функциональной деятельности головного мозга. Для этого было изучено включение ^{14}C во фракции фосфолипидов нейронов и нейроглии (табл. 3).

Представленные в табл. 3 данные свидетельствуют о том, что через 60 мин после введения ацетата-2- ^{14}C наибольшей удельной радиоактивностью как в нейронах, так и в нейроглии обладают фосфатидиновые кислоты. Это не удивительно, так как они являются не только непосредственными предшественниками фосфоглицеридов, но и принимают активное участие в процессах, связанных с транспортом ионов через мембраны и секрецией нейромедиаторов [15, 20]. Уровень удельной радиоактивности фосфатидиновых кис-

лот в нейронах в среднем в 2 раза выше их радиоактивности в нейроглии. В нейронах также высока степень включения ^{14}C в сфингомиелины по сравнению с нейроглией. Удельная радиоактивность сфингомиелинов в нейронах достигает 613 ± 34 имп/мин мг С и превышает уровень активности сфингомиелинов нейроглии в 2 раза. Такое различие в метаболической активности сфингомиелинов связано с двойственностью функций, которые они выполняют в нервной системе: с одной стороны, динамическая функция, связанная с высоким уровнем метаболизма в телах нейронов, и с другой — структурная функция в мембранах нейроглии и миелине [3]. Это еще раз подтверждает тезис об универсальности фосфолипидов, в которых наряду с белками наиболее ярко проявляется единство структуры и функций биологических молекул [1]. Этим свойством обладают и фосфатидилсерины, которые метаболизируют значительно интенсивнее в нейронах, чем в нейроглии. К тому же при исследовании включения меченных ^{14}C серина и этаноламина в фосфолипиды нейронов и нейроглии было показано, что фракция, обогащенная нейронами, значительно быстрее включает радиоактивный предшественник в фосфолипиды [6]. Высокая степень обмена лизохолинфосфатидов в нейронах объясняется не только тем, что они являются предшественниками фосфатидилхолинов, но и тем, что они функционируют как основной источник холина нервной ткани, потребность в котором выше в нейронах, чем в нейроглии [21]. Включение ацетата- $2\text{-}^{14}\text{C}$ в фосфатидилхолины нейронов незначительно превышает включение радиоактивного углерода в фосфатидилхолины нейроглии. В нейронах наблюдается более высокий уровень обмена монофосфоинозитидов и фосфатидилэтанолламинов. Так, удельная радиоактивность монофосфоинозитидов в нейронах превышает их радиоактивность в нейроглии в 2 раза, а фосфатидилэтанолламинов — в 4 раза. Такие резкие различия в удельной радиоактивности фосфатидилэтанолламинов можно объяснить тем, что в нейронах синтез как диацильных, так и плазмалогенных форм этих фосфолипидов протекает значительно эффективнее, чем в нейроглии [9].

Представленные данные свидетельствуют о том, что примененная нами схема выделения нейронов и нейроглии из коры головного мозга позволяет получить достаточное количество клеточного материала для дальнейшего биохимического анализа. Обнаружено, что для нейронов характерен более высокий уровень обмена отдельных фракций фосфолипидов по сравнению с нейроглией. Это указывает на более интенсивное протекание мембранных процессов в нервных клетках в единой функциональной системе нейрон — нейроглия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крепс Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира (Баховские чтения. № 22). Л., 1967. — 2. Freysz L., Biele R., Judes C. et al. — *J. Neurochem.*, 1968, v. 15, p. 307—313. — 3. Freysz L., Biele R., Mandel P. — *Ibid.*, 1969, v. 16, p. 1417—1424. — 4. Hamberger A., Svennerholm L. — *Ibid.*, 1971, v. 18, p. 1821—1829. — 5. Norton W. T., Poduslo S. E. — *J. Lipid Res.*, 1971, v. 12, p. 84—89. — 6. Sprinivas R., David R., Kanfer J. — *J. biol. Chem.*, 1972, v. 247, p. 7153—7156. — 7. Gorassi G., Blomstrand C. — *J. Neurochem.*, 1973, v. 20, p. 1167—1180. — 8. Binaglia L., Goracci G., Porcellati G. et al. — *Ibid.*, v. 21, p. 1067—1082. — 9. Binaglia L., Roberti R., Francescangeli E. et al. — *Lipids*, 1974, v. 9, p. 738—747. — 10. Freysz L., Mandel P. — *FEBS Letters*, 1974, v. 40, p. 110—113. — 11. Woelk H., Kanig K., Peiler-Ichikawa K. — *J. Neurochem.*, 1974, v. 23, p. 1057—1063. — 12. Sellinger O. Z., Azcurra I. M., Johnson D. E. et al. — *Nature, New Biol.*, 1971, v. 230, p. 253—256. — 13. Lowery O. H., Rosenbrough N. I., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265—275. — 14. Folch I., Less M., Sloane-Stanley G. H. — *Ibid.*, 1957, v. 266, p. 497—500. — 15. Yagihara Y., Bleasdale I. E., Hawthorne J. N. — *J. Neurochem.*, v. 21, p. 173—190. — 16. Флеров М. А., Зубер В. Л. — *Вопр. мед. химии*, № 2, с. 211—216. — 17. Bartlett G. — *J. biol. Chem.*, 1959, v. 234, p. 466—474. — 18. Norton W. T., Poduslo S. E. — *Science*, 1970, v. 167, p. 1144—1150. — 19. Чирковская Е. В., Помазанская А. Ф., Красильникова В. И. — Тезисы научных сообщений 7-й нейрохимической кон-

ференции. Л., 1976, с. 82. — 20. Hawthorne I. N., Bleasdale I. E. — «Molec. Cell. Biochem.», 1975, v. 8, p. 83—87. — 21. Illingworth D. R., Portman O. W. — «Biochem. J.», 1972, v. 130, p. 557—576.

Поступила 15/III 1977 г.

DISTRIBUTION AND METABOLISM OF PHOSPHOLIPIDS IN NEURONS AND NEUROGLIA

M. A. Flerov

Laboratory of Nervous System Biochemistry, Institute of Physiology, A. A. Zhdanov State University, Leningrad

Ratio and intensity of metabolism of phospholipid separate fractions were studied in neurons and neuroglia, isolated from brain cortex by differential ultracentrifugation in density gradient of sucrose and Ficoll with the rate of enriching up to 90% and 80%, respectively. Neurons were characterized by the higher ratio of monophosphoinositides and lysophosphatidyl cholines as compared with neuroglia. Content of phosphatide acids and sphingomyelins was higher in neuroglia. The most specific radioactivity was observed in phosphatide acids both in neurons and neuroglia if $2\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate was administered. Neurons were shown to have higher metabolism of the separate fractions of phospholipids.

УДК 615.917'262.036.11.07:616.831-008.9-074.092.9

Я. И. Векслер, К. М. Магомедова, В. М. Луговец

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА СТРЕСС ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Кафедра биохимии Дагестанского медицинского института, Махачкала

Метаболическая реакция на стресс центральной нервной системы (образование и связывание аммиака в головном и спинном мозге) существенно изменяется при остром алкогольном опьянении. Нарушается дезамидирование белков мозга, понижаются интенсивность образования аммиака и содержание мочевины, изменяется содержание γ -аминомасляной кислоты, дикарбоновых аминокислот и их амидов.

Патогенетические механизмы утомления при острой и хронической алкогольной интоксикации до сих пор не выяснены. В литературе нет сведений об особенностях метаболической реакции на стресс центральной нервной системы пораженного алкоголем организма.

В то же время изучение этого вопроса представляет определенный теоретический и практический интерес. В связи с этим нами предпринято сравнительное исследование метаболической реакции центральной нервной системы на стресс у интактных животных и животных в состоянии острого алкогольного опьянения.

Методика

Наблюдения проведены на белых крысах-самцах весом 150—180 г. Острое алкогольное отравление вызывали пероральным введением 1 мл 96% этилового спирта на 1 кг веса тела. Спустя 1 ч после приема алкоголя, когда изменения обмена в головном и спинном мозге были четко выражены, подопытных животных заставляли выполнять тяжелую физическую работу — плавать в воде при температуре 28—30°C с грузом, составляющим 10% от веса тела. Это вынуждало крыс активно двигаться до полного утомления, так как прекращение движений влекло за собой погружение под воду и гибель. Преимуществом модели было и то, что в работу вовлекалась вся скелетная мускулатура, благодаря чему развивающееся утомление было генерализованного характера и охватывало обширные области головного и спинного мозга.

Чтобы отдифференцировать изменения в центральной нервной системе, вызванные утомлением, от изменений, являющихся следствием периода вработывания и адаптации к физической нагрузке, мы, как и многие авторы [1—4], вели исследование в динамике: через 15 мин после начала плавания, на высоте развития утомления и в восстановительном периоде — через 1 ч после прекращения работы. Одновременно проводили наблюдения за животными контрольной группы, не получившими алкоголя.

Т а б л и ц а 1

Изменение некоторых показателей азотистого обмена головного мозга при развитии утомления у intactных крыс

Период наблюдения	Аммиак	Глутамин	Аспартат	Глутамат	ГАМК	Мочевина	Амидные группы суммарных белков, мкг на 1 мг белка		
	мг на 100 г ткани						суммарные	лабильные	прочносвязанные
До плавания	$0,52 \pm 0,01$	$6,15 \pm 0,09$	$37,4 \pm 0,92$	$113 \pm 1,6$	$18 \pm 0,27$	$30 \pm 0,8$	$5,0 \pm 0,04$	$1,8 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,07$
15 мин плавания	$0,94 \pm 0,03$	$12,1 \pm 0,20$	$40,2 \pm 0,64$	$99 \pm 2,11$	$23,1 \pm 0,53$	$32,6 \pm 0,73$	$4,61 \pm 0,08$	$1,69 \pm 0,04$	$2,92 \pm 0,09$
Утомление	$2,5 \pm 0,05$	$10,9 \pm 0,1$	$34,8 \pm 0,71$	$77 \pm 1,0$	$23 \pm 0,53$	$49,2 \pm 0,86$	$3,8 \pm 0,08$	$0,72 \pm 0,02$	$3,08 \pm 0,07$
После 1 ч отдыха	$1,5 \pm 0,04$	$10,7 \pm 0,15$	$35 \pm 0,83$	$100 \pm 0,91$	$21 \pm 0,39$	—	$4,3 \pm 0,09$	$1,4 \pm 0,08$	$2,9 \pm 0,11$

Т а б л и ц а 2

Показатели азотистого обмена спинного мозга при развитии утомления у intactных крыс

Период наблюдения	Аммиак	Глутамин	Аспартат	Глутамат	ГАМК	Мочевина	Амидные группы суммарных белков, мкг на 1 мг белка		
	мг на 100 г ткани						суммарные	лабильные	прочносвязанные
До плавания	$0,61 \pm 0,02$	$5,7 \pm 0,07$	$39,8 \pm 0,91$	$91 \pm 1,56$	$8,6 \pm 0,23$	$26 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,07$	$1,5 \pm 0,06$	$3,0 \pm 0,11$
15 мин плавания	$0,85 \pm 0,02$	$9,4 \pm 0,09$	$45 \pm 0,77$	$84,8 \pm 0,56$	$14,5 \pm 0,44$	$33,6 \pm 0,94$	$4,2 \pm 0,64$	$1,6 \pm 0,00$	$2,6 \pm 0,57$
Утомление	$4,63 \pm 0,10$	$5,8 \pm 0,07$	$30 \pm 0,64$	$81,4 \pm 0,81$	$16 \pm 0,28$	$24,5 \pm 0,48$	$1,7 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,00$	$0,92 \pm 0,03$
После 1 ч отдыха	$2,8 \pm 0,04$	$8,2 \pm 0,09$	$24 \pm 0,48$	$76 \pm 2,33$	$16,3 \pm 0,65$		$1,82 \pm 0,06$	$1,22 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,04$

В соответствующие сроки крыс умерщвляли мгновенным погружением в жидкий воздух. В головном и спинном мозге определяли содержание свободного аммиака фенол-гипохлоритным методом [5], глутамин по А. И. Силаковой [6], дикарбоновых аминокислот и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) методом электрофореза [7], мочевины по Г. Бухнер [8] и амидных групп суммарных белков по З. С. Гершенвичу и А. А. Кричевской [9].

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что у контрольных животных уже в первые 15 мин плавания наблюдается резкое и прогрессирующее накопление аммиака в тканях спинного (на 39 %) и особенно головного (на 81 %) мозга (табл. 1 и 2). Одновременно значительно увеличивается содержание мочевины (на 10 % в головном и на 29 % в спинном мозге), ГАМК (соответственно на 28 и 69 %), аспартата и глутамин и наблюдается дезамидирование суммарных белков мозга с некоторым изменением коэффициента лабильности амидных связей, особенно в спинном мозге.

Развитие утомления сопровождается резким увеличением содержания в головном мозге глутамин, мочевины и ГАМК. В спинном мозге концентрация глутамин и мочевины существенно не изменяется, а уровень ГАМК возрастает значительно больше, чем в головном мозге (на 86 %; в головном мозге на 28 %). Уровень аспартата в головном мозге почти не изменяется, а в спинном — резко понижается. Происходят глубокие изменения в амидированности белков центральной нервной системы с изменением соотношения лабильных и прочносвязанных амидных групп (коэффициента лабильности); при этом коэффициент лабильности в головном мозге понижается с 0,56 до 0,23, в спинном мозге, напротив, возрастает с 0,5 до 0,84; содержание амидного азота суммарных белков головного мозга понижается на 25 %, а спинного мозга — на 62 %.

Иная картина наблюдается у животных при реакции на стресс в состоянии острой алкогольной интоксикации (табл. 3 и 4). И в головном, и в спинном мозге подопытных крыс в отличие от контрольных стрессорная реакция характеризуется не повышением, а, напротив, резким снижением уровня аммиака в мозговой ткани. Такое снижение более выражено и развивается быстрее в головном мозге. Даже после 1 ч отдыха исходный уровень аммиака не восстанавливается.

Так же изменяется содержание глутамин. Если у животных контрольной группы в условиях стресса содержание глутамин увеличивается и он выступает как фактор детоксикации огромных количеств накапливающегося аммиака, то в состоянии опьянения глутамин эту функцию не выполняет. Напротив, происходит его интенсивное дезамидирование и он, по-видимому, является одним из мощных источников образования аммиака.

Изменения содержания ГАМК тоже противоположного характера. У контрольных животных развитие утомления сопровождается значительным накоплением ГАМК в мозге, особенно спинном. У подопытных крыс содержание ГАМК в головном мозге резко понижается — более чем в 2 раза, удерживаясь на этом низком уровне даже после 1 ч отдыха. В спинном мозге наблюдается лишь незначительное повышение уровня ГАМК, особенно на высоте развития утомления.

Обращают на себя внимание и характерные изменения содержания мочевины в головном и спинном мозге у крыс разных групп. Если у контрольных животных реакция на стресс сопровождается нарастанием содержания мочевины в тканях мозга, то у крыс в состоянии опьянения ее уровень резко понижается (в 3 раза и более).

Весьма демонстративны различия и в реакции амидных групп суммарных белков мозга. У контрольных животных реакция на стресс протекает на фоне значительного и все возрастающего дезамидирования белков. При острой алкогольной интоксикации, напротив, повышается амидированность белков, особенно значительно в тканях головного мозга.

Т а б л и ц а 3

Изменения некоторых показателей азотистого обмена головного мозга при развитии утомления у крыс в состоянии алкогольного опьянения

Период наблюдения	Аммиак	Глутамин	Аспартат	Глутамат	ГАМК	Мочевина	Амидные группы суммарных белков, мкг на 1 мг белка		
	мг на 100 г ткани						суммарные	лабильные	прочность- занные
До плавания	4,65±0,24	21,9±0,73	11,3±0,32	32,8±0,45	16,3±0,31	60,4±0,79	2,22±0,041	0,98±0,038	1,24±0,054
15 мин плавания	1,46±0,07	6,72±0,45	18,3±0,50	29,2±1,21	6,84±0,32	13,1±0,79	4,06±0,04	1,14±0,03	2,92±0,21
Утомление	3,20±0,12	13,1±0,12	21,9±0,48	52,8±0,98	9,52±0,50	20,5±0,93	3,77±0,05	1,62±0,09	2,15±0,12
После 1 ч отдыха	2,34±0,10	9,06±0,19	15,4±0,60	45,4±0,89	6,78±0,20	19,4±0,65	3,34±0,06	1,09±0,02	2,25±0,07

Т а б л и ц а 4

Изменения некоторых показателей азотистого обмена спинного мозга крыс при развитии утомления в состоянии алкогольного опьянения

Период наблюдения	Аммиак	Глутамин	Аспартат	Глутамат	ГАМК	Мочевина	Амидные группы суммарных белков, мкг на 1 мг белка		
	мг на 100 г ткани						суммарные	лабильные	прочность- занные
До плавания	6,21±0,23	15,6±0,39	16,3±0,32	56,5±0,41	6,79±0,17	41,9±0,78	2,13±0,066	0,75±0,02	1,37±0,07
15 мин плавания	3,47±0,07	7,98±0,13	21,9±0,65	28,4±1,0	7,78±0,37	23,4±0,64	3,16±0,05	1,78±0,05	1,38±0,06
Утомление	4,58±0,14	7,58±0,11	19,7±0,74	34,1±1,18	8,27±0,46	17,7±0,66	2,99±0,03	1,71±0,06	1,28±0,07
После 1 ч отдыха	3,15±0,03	8,71±0,08	18,3±0,45	26,3±0,58	7,61±0,23	21,3±0,60	4,17±0,08	2,24±0,06	1,93±0,09

Полученные данные свидетельствуют о существенном изменении характера метаболической реакции центральной нервной системы на выполнение физической работы и развитие утомления у животных в состоянии острой алкогольной интоксикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рогозкин В. А. — «Укр. біохім. ж.», 1959, № 4, с. 489—494. — 2. Погодаев К. И. — В кн.: Стресс и его патогенетические механизмы. Кишинев, 1973, с. 34—35. — Векслер Я. И., Арбуханова М. С., Мамцева Г. Х. — В кн.: Актуальные проблемы стресса. Кишинев, 1976, с. 44—55. — 4. Арбуханова М. С. Энергетический обмен головного и спинного мозга при утомлении. Дис. канд. Махачкала, 1972. — 5. Brown R. H. — «Arch. Biochem.», 1957, v. 66, p. 301. — 6. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. — «Вопр. мед. химии», 1962, № 5, с. 538—544. — 7. Dose K. — «Biochem. Z.», 329, Bd 416, S. 1957. — 8. Buchner H. — «Cancer Res.», 1955, v. 15, p. 365. — 9. Гершеневич З. С. — «Биохимия», 1960, № 2, с. 310—317.

Поступила 23/II 1977 г.

CHARACTERISTICS OF METABOLIC RESPONSE OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM ON THE STRESS IN ACUTE ALCOHOL INTOXICATION

Ya. I. Vexler, K. M. Magomedova, V. M. Lugovetz

Chair of Biochemistry, Dagestan Medical School, Makhachkala

In a state of acute alcohol intoxication metabolic response on the stress of the central nervous system was distinctly altered in rats (formation and binding of ammonia in brain and medulla spinalis). The following effects were observed: deamidation of brain proteins was impaired, the intensity of ammonia formation was decreased, content of urea decreased and dynamics of gamma aminobutyric acid, dicarbonic amino acids and their amides was altered.

УДК 612.438.015.1:577.152.271-06:576.851:555

С. Н. Силуянова, В. В. Еременко

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ТИМИДИНА С УЧАСТИЕМ ТИМИДИНКИНАЗЫ ИЗ ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПЕЧЕНИ КРЫС В ПРИСУТСТВИИ ФАКТОРА ИЗ CL. PERFRINGENS (WELCHII)

Кафедра биохимии I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова

Показано активирующее влияние фактора CPW, выделенного из культуры *Cl. perfringens* (welchii), на латентную тимидинкиназу из печени крыс после 42 дней развития животного. Фактор CPW активирует в $3^{1/2}$ раза и латентную тимидинкиназу из зобной железы крыс, появляющуюся в ходе инволюции органа. Полученные данные подтверждают предположение о том, что механизм увеличения активности тимидинкиназы в пролиферирующих тканях связан с активацией латентных ферментов.

Работами ряда авторов [1—3] показано повышение активности тимидинкиназы в ткани регенерирующей печени через 18 ч после гепатэктомии; через 32 ч активность фермента достигала максимума, а затем заметно снижалась. Это увеличение активности могло быть или следствием активации фермента, или обуславливаться синтезом de novo.

Шиозака и соавт. [4] обнаружили в фильтрате культуры *Cl. perfringens* белковый фактор, активирующий in vitro тимидинкиназу из печени и не влияющий на ферментативную активность препаратов из регенерирующей печени и саркомы Йосиды. Авторы предположили, что активация тимидинкиназы связана с существованием неактивной формы фермента, которая активируется фильтратом культуры *Cl. perfringens*. Цель настоящей работы — изучение влияния фильтрата культуры *Cl. perfringens welchii* SR-12 CPW на активность тимидинкиназы из зобной железы крысы.

Методика

Тимидинкиназу получали из зобной железы крыс по описанному ранее методу [5]. Для получения препаратов фактора Н (из печени крысы) 3 г ткани гомогенизировали в 27 мл трис-НСI-буфера в течение 15 мин и надосадочную жидкость использовали для дальнейшей очистки. Выделение и очистку фактора Н производили по методике, описанной Фонде и Окуда [6], с незначительными модификациями: стабилизирующим агентом был тимидин вместо АТФ, так как последний вызывал частичную инактивацию фактора в процессе инкубации; время инкубации было снижено с 30 до 20 мин; фракционирование сульфатом аммония проводили дробно в пределах 0—30 и 30—40% насыщения, что позволило повысить удельную активность фактора на этом этапе в 2 раза. Для получения фильтрата CPW NCTC 6784 культуры выращивали на среде следующего состава: мясная вода — 500 мл, сухой дрожжевой экстракт — 5 г, триптический гидролизат казеина — 50 мл, пептон — 10 г, NaCl — 5 г, глюкоза — 20 г, KH_2PO_4 — 2 г, вода водопроводная — до 1 л. Величина pH после стерилизации составляла 7,2—7,5. Для засева использовали 16—18-часовую культуру, выращенную на той же среде, дозы засева составляли около 10% по объему. Культуры выращивали в 3-литровых бутылках, содержащих по 2 л среды, или в пробирках объемом 60 мл. Для создания анаэробных условий в среду добавляли мясной фарш и вату. Посев производили сразу же после автоклавирования и охлаждения среды. Культуру выращивали в течение 76 ч при 37°C. Культуральную среду отделяли от клеток центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 15 мин при 4°C. Полученная надосадочная жидкость была использована для получения белкового фактора. Белковый фактор выделяли первоначально по методике, описанной Шиозака и соавт. [4], с незначительными изменениями: трис-малсатный буфер заменяли трис-НСI-буфером, pH реакционной смеси был доведен с 6,5 до 7,0, время инкубации снижено с 30 до 20 мин. В последующем методика выделения была несколько изменена. Центрифугат культуральной среды 76-часовой культуры CPW фракционировали сульфатом аммония. С этой целью к надосадочной жидкости медленно, при постоянном помешивании добавляли до концентрации 0,665 г/мл сульфат аммония (95% насыщения), смесь оставляли на ночь. Выпавший осадок белка отделяли центрифугированием, затем растворяли в 10—15 мл 5 мМ трис-НСI-буфера pH 7,0 и обессоливали пропусканием через колонку сефадекса G-25, предварительно уравновешенную 5 мМ трис-НСI-буфером pH 7,0. Аликвота фракции была обработана предварительно охлажденным (до -10°C) ацетоном до конечной концентрации 86%. Выпавший осадок белка собирали центрифугированием при 12 000 об/мин в течение 15 мин и растворяли в 5—10 мл трис-НСI-буфера. Дальнейшую очистку фактора производили фракционированием сульфатом аммония. С этой целью к фракции, полученной после диализа через колонку, добавляли сульфат аммония до концентрации 0,279 г/мл (50% насыщения), выдерживали 30 мин, выпавший осадок белка собирали центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 15 мин и растворяли в 5 мл 5 мМ трис-НСI-буфера pH 7,0 с последующим диализом в течение 8 ч против дважды сменяемого указанного выше буфера. С целью дальнейшей очистки диализованную фракцию подвергали обработке гидроксипапатитом из расчета 2 мг сухого геля на 1 мг белка при постоянном помешивании в течение 5 мин. Суспензию центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 15 мин. Гель отбрасывали, а надосадочную жидкость снова подвергали фракционированию сульфатом аммония от 0—70% насыщения (добавляли соль до концентрации 0,437 г/мл). Смесь оставляли на 1 ч, затем центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 15 мин, осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость диализовали против 5 мМ трис-НСI-буфера pH 7,0. Диализованная надосадочная жидкость была использована как белковый фактор фильтрата культуры CPW. Рост бактерий определяли по изменению оптической плотности культуральной жидкости, которую измеряли на ФЭК-56 с зеленым фильтром в кюветах с длиной оптического пути 5 мм.

Состав инкубационных проб для определения активности тимидинкиназы: $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидин — 0,1 мкМ (30 000 имп/мин), АТФ — 10 мкМ, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ — 10 мкМ, 0,05 М трис-НСI-буфер pH 7,0, фактор Н — 0,01 мг, фактор CPW — 0,01 мг, белок тимидинкиназы из зобной железы — 0,006—1,3 мг. Объем пробы 0,5 мл. Пробу инкубировали в течение 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали погружением проб в кипящую водяную баню на 3 мин. Продукты реакции разделяли по методу Филипповича и Романцева [7]. Образцы проб (0,05 мл) наносили на кусочки бумаги AE-81 (3×3 см), высушенную бумагу помещали в водонасыщенный n-бутанол (из расчета 25 мл на 1 диск) и интенсивно встряхивали в течение 20 мин. Затем бутанол сливали, диски заливали новой порцией водонасыщенного n-бутанола и процедуру отмывки повторяли. Отмытые от нуклеозидов диски высушивали эфиром, помещали в 12 мл сцинтилляционной жидкости [4 г 2,5-дифенилоксазола и 0,2 г в 1 л толуола 1,4-бис-2 (фенилоксазолил) бензола] и радиоактивность в образцах подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Picker Nuclear» с эффективностью счета для ^{14}C около 90%. Белок определяли по методу Лоури [8] после осаждения трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Без осаждения ТХУ определяли намного большие количества белка. Различные результаты, обнаруженные этим методом, указывают на то, что большая часть балластного материала была низкого молекулярного веса.

Диск-электрофорез белкового фактора из фильтрата культуры CPW проводили в 7% полиакриламидном геле с использованием 0,05 М трис-НСI-буфера pH 8,6 [9]. На трубки геля наносили белок, концентрация которого была 100 мкг/мл.

Результаты и обсуждение

Данные по очистке фактора CPW представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, фактор был очищен в 1100 раз с выходом 10 %. Полученный препарат исследован на гомогенность с помощью дискового электрофореза в полиакриламидном геле, и были выявлены две зоны. Биологическую активность фактора CPW определяли по степени активации латентной ти-

Таблица 1
Очистка фактора из фильтрата культуры CPW

Этап очистки	Активность, ед	Количество белка, мг	Удельная активность, ед/мг	Выход, %
Фильтрат культуры	38,4	12 400	3,1	100
Обработка сульфатом аммония 0—95%	30,2	130	232,5	78
Обработка ацетоном 0—86%	10,46	30	348,76	27
Обработка сульфатом аммония 0—50%	7,2	18,3	395	18
Обработка гелем фосфата кальция	6,8	4,9	1382,5	17
Обработка сульфатом аммония 0—70%	4,1	2,4	3455,5	10,6

Таблица 2
Очистка фактора Н из препаратов зрелой печени крысы

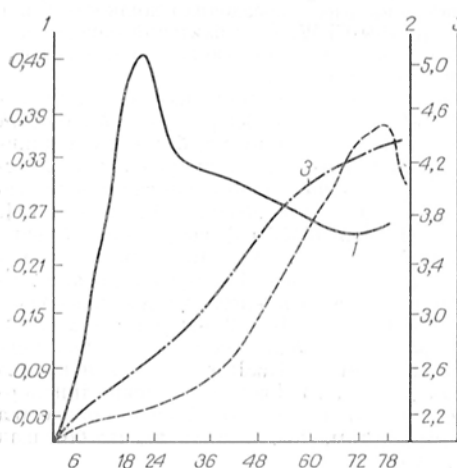
Этап очистки	Удельная активность, ед/мг		Активность, ед.	Количество белка, мг	Выход, %
	в отсутствие фактора CPW	в присутствии фактора CPW			
Грубый экстракт	0,03	0,26	132,6	510	100
Осаждение при pH 5,0	0,09	1,08	126,36	117	87
Обработка сульфатом аммония 0—40%	0,36	5,4	102,6	19	77

мидинкиназы (фактора Н), выделенной из экстракта зрелой печени крысы. Этапы очистки латентной тимидинкиназы представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, фактор из печени был очищен в 21 раз по сравнению с исходным экстрактом с выходом 77 %. На каждой стадии очистки

активность тимидинкиназы была очень низкой перед обработкой фермента фактором CPW. В то же время активность фермента заметно повышалась после обработки указанным выше белковым фактором. Активность фермента в клетках микроорганизмов обычно сильно колеблется в зависимости от условий выращивания, присутствия индукторов и репрессоров, а также от времени выращивания. Поскольку сведения относительно образования фактора CPW отсутствуют, мы провели ряд опытов с целью изучения влияния некоторых параметров на накопление этого фактора в растущих культурах.

Результаты опытов по изучению динамики роста, изменения активности белкового фактора и



Зависимость содержания фактора CPW от возраста культуры и условий среды.

По оси абсцисс — время роста культуры (в ч). 1 — рост (в ед. экстинкции); 2 — удельная активность (в н-моль/мг); 3 — концентрация белка (в мг).

pH культуральной жидкости представлены на рисунке, из которого видно, что фактор CPW в культуральной среде накапливается главным образом после прекращения роста культуры, достигая максимума к 76 ч. Одновременно с ростом происходит закисление среды, и значение pH к концу роста становится равным 4,5. При посеве микроорганизма на среду при pH 5,0 роста не происходит. Выращивание CPW в условиях поддержания исходного значения pH на уровне 7,0 путем добавления раствора NaOH не влияло ни на

рост, ни на изменение активности фактора. Иными словами, активность фактора CPW зависит не от изменения pH среды, а от возраста культуры. При определении содержания белка в среде на всем протяжении роста культуры было установлено, что концентрация его повышается и достигает максимума к 64 ч роста (см. рисунок, кривая 3), когда четко обозначился лизис культуры (см. рисунок, кривая 1). Наблюдающиеся изменения активности фактора в культуре в зависимости от фаз роста свидетельствуют о том, что содержание фактора в культуре регулируется каким-то механизмом, проявление которого связано с возрастом культуры.

Работами Шиозака было показано, что фильтрат из культуры *Cl. perfringens* активизирует тимидинкиназу из зрелой крысиной печени [4].

В связи с этим представляло интерес изучить влияние фактора из культуры CPW на препараты из печени в зависимости от возраста животного. Нами были взяты ферментные препараты из печени 14-, 21-, 42-дневных и зрелых крыс. Полученные данные суммированы в табл. 3.

Как видно из табл. 3, латентная тимидинкиназа (фактор Н) появляется в печени крыс после 42 дней, о чем свидетельствуют данные по максимальному фосфорилированию тимидина в этот период времени.

Дальнейшие исследования были предприняты с целью изучения влияния фактора CPW на активность тимидинкиназы из зубной железы крысы.

Из данных литературы [4, 10] известно, что фактор из культуры *Cl. perfringens* не влиял на активность тимидинкиназы из регенерирующей печени и саркомы Йосиды. В связи с тем что зубная железа — это орган, развитие которого тесно связано с возрастом животного, представляло интерес изучить зависимость активности тимидинкиназы в зубной железе от возраста. Для этого использовали молодых животных массой до 200 г и зрелых крыс, у которых зубная железа подверглась частичному жировому перерождению. Полученные данные представлены в табл. 4.

Таблица 3
Влияние фактора CPW на тимидинкиназу из печени животных разного возраста

Животные	Удельная активность киназы, ед/мг	
	в присутствии CPW	в отсутствие CPW
14-дневные (70 г)	0,09	0,03
21-дневные (100 г)	0,18	0,06
42-дневные (150—200 г)	0,42	0,12
Массой до 300 г	5,2	0,35

Примечание. В пробе 0,15 мг белка. Содержание 2^{14}C -тимидина 0,025 мкм (30 000 имп/мин).

Таблица 4
Влияние фактора CPW на активность тимидинкиназы из зубной железы крысы

Условия определения активности тимидинкиназы	Удельная активность тимидинкиназы, имп/мин мг белка	
	нормальная зубная железа	зубная железа с частичным жировым перерождением
В отсутствие фактора CPW	528 000	176 000
В присутствии фактора CPW	517 000	645 300

Примечание. В пробу вносили 2^{14}C -тимидин (0,025 М, 22 000 имп/мин).

Как видно из табл. 4, если фермент выделяется из нормальной ткани зобной железы, то фактор CPW никакого влияния на активность тимидинкиназы не оказывает. В случае, когда выделение фермента осуществляется из ткани в стадии инволюции, то происходит увеличение активности киназы, причем после добавления в инкубационную среду фактора CPW активность тимидинкиназы из инволюционной ткани увеличивается в $3^{1/2}$ раза и становится в $1^{1/2}$ раза выше, чем в нормальной ткани.

Таким образом, можно провести некоторую параллель, сопоставив результаты по активации латентной тимидинкиназы из печени взрослых крыс и тимидинкиназы из зобной железы крыс в ходе инволюции этого органа. По-видимому, в процессе старения и инволюции органа появляется латентная тимидинкиназа, которая не способна фосфорилировать тимидин. Действие фактора CPW заключается в том, что он активирует эту латентную тимидинкиназу. В связи с этим полученные данные подтверждают предположение о том, что механизм увеличения активности тимидинкиназы в пролиферирующих тканях связан с активацией латентных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ольшанецкая А. Д., Карелина Л. П., Новикова М. А. — «Биохимия», 1968, т. 33, с. 228. — 2. Ольшанецкая А. Д. — Тезисы секционных сообщений 2-го Всесоюзного биохимического съезда. Секция 3. Ташкент, 1969, с. 69. — 3. Bresnik E. — «J. biol. Chem.», 1965, v. 240, p. 2550. — 4. Shiosaka T., Omura J., Okuda M. et al. — «Biochim. biophys. Acta», 1970, v. 204, p. 352. — 5. Силуанова С. Н. — «Вопр. мед. химии», 1975, № 1, с. 44. — 6. Foide H. — «Biochim. biophys. Acta», 1970, v. 217, p. 221. — 7. Филиппович И. В., Романцев Л. Ф. — «Радиобиология», 1968, № 5, с. 680—683. — 8. Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 9. Davis B. J., Orstein L. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1964, v. 121, p. 404. — 10. Shiosaka T. — «Biochim. biophys. Acta», 1971, v. 246, p. 171.

Поступила 5/III 1977 г.

EFFECT OF THYMIDINE KINASE FROM RAT STRUMOUS GLAND AND LIVER ON THYMIDINE PHOSPHORYLATION IN PRESENCE OF CPW FACTOR FROM CLOSTRIDIUM PERFRINGENS/WELCHII

S. N. Siluyanova, V. V. Eremenko

Chair of Biochemistry, I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

Factor CPW, isolated from *Cl. perfringens/welchii* was shown to activate latent thymidine kinase (factor N) from liver tissue of rats beginning from 42 days age. CPW factor activated 3.5-fold also thymidine kinase from rat strumous gland; the enzyme was observed during involution of the tissue. The data obtained suggest that increase in thymidine kinase activity in proliferating tissues is related to activation of latent enzymes.

УДК 615.917'558.1.07:616.831/.831-008.939.6'915

Н. П. Таранова

ГЛИКОЛИПИДЫ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ТРИКРЕЗИЛФОСФАТОМ

Кафедра биохимии I Ленинградского медицинского института им. акад. И. П. Павлова

Экспериментальную модель нейропаралитической формы интоксикации трикрезилфосфатом воспроизводили на морских свинках путем его однократного внутрикожного введения. У 66% животных развивались средняя и тяжелая формы заболевания с глубокими парезами и параличами задних конечностей. Содержание специфических для миелина галактолипидов (цереброзидов+сульфатидов) в стволе головного мозга и пояснично-крестцовом отделе спинного мозга этих животных снижалось соответственно на 9,0 и 22,9%, что подтверждает деструкцию миелина. В пояснично-крестцовом отделе спинного мозга обнаружено также снижение содержания ганглиозидов (на 19,1%), локализирующихся главным образом в нейрональных мембранах, что свидетельствует о дегенеративных изменениях не только в миелине, но и в нейрональных структурах.

Значительное место в патологии нервной системы занимают демиелинизирующие заболевания в результате хронической интоксикации фосфорорганическими соединениями (ФОС), широко применяемыми в промышленности и сельском хозяйстве. Наиболее выраженным нейротоксическим действием, не связанным с их антихолинэстеразными свойствами, обладают диизопропилфторфосфат, мипафокс и трикрезилфосфаты, среди которых наиболее токсичен триортокрезилфосфат. Они вызывают специфическую вторичную демиелинизацию нервной ткани, что приводит к развитию стойких парезов и параличей конечностей [1—3].

Поскольку, по современным представлениям об ультраструктуре миелина, отводят главную роль в его молекулярной организации липидным ансамблям [4], при исследовании механизма демиелинизирующего действия ФОС становится очевидной необходимость выявления нарушений в липидном составе миелина. Несмотря на стереотипность клинической картины отравлений у людей, экспериментальной модели нейропаралитической формы интоксикации у млекопитающих долгое время не существовало и исследования проводились главным образом на курах [5—9]. Разработанная Зильбером [2, 10] и Дворкиным [11] экспериментальная модель демиелинизации, вызванной трикрезилфосфатом у морских свинок, дает возможность всестороннего и систематического исследования его повреждающего действия на нервную систему млекопитающих.

Задачей настоящей работы было исследование количественных изменений содержания галактолипидов (цереброзидов + сульфатидов) и ганглиозидов в головном и спинном мозге морских свинок при хронической интоксикации трикрезилфосфатом.

Методика

Исследования проводили на взрослых морских свинках-самцах, которым однократно внутривенно вводили трикрезилфосфат (промышленная маслоподобная смесь, содержащая 37% ортоизомера трикрезилфосфата) в дозе 2,0—2,2 мл/кг массы. Степень тяжести заболевания у подопытных животных оценивали по критериям, приведенным в табл. 1. Через 25—30 дней после введения трикрезилфосфата животных с тяжелой симптоматикой нейропаралитического действия забивали и извлекали стволную часть головного мозга и пояснично-крестцовый отдел спинного мозга для биохимического анализа.

Таблица 1
Оценка тяжести клинических проявлений нейротоксического действия трикрезилфосфата у морских свинок

Форма заболевания	Степень тяжести	Клинические проявления
Легкая (восстанавливающаяся)	++	Малоподвижность задних конечностей, атаксия Выраженная слабость мышц задних конечностей, затруднение при передвижении, уменьшение межпальцевого расстояния, увеличение длины свободно свисающей лапы, легкие парезы задних конечностей, потеря в массе до 12—15%
Средняя (мембранотоксическая)	+++	Слабость мышц задних конечностей, межпальцевое расстояние отсутствует, длина свободно свисающей лапы увеличена максимально (до 45—50 мм), передвижение затруднено, выраженные парезы задних конечностей, кахексия, потеря 15—20% веса, резкое ослабление тонуса межреберных мышц
Тяжелая (часто легальная)	++++	Межпальцевое расстояние отсутствует, пальцы сомкнуты и согнуты в кулак, длина свободно свисающей лапы максимальная, глубокие парезы и параличи задних конечностей, кахексия, потеря в массе до 20%, тонус межреберных мышц резко ослаблен, дыхание нарушено

Липиды экстрагировали из гомогената ткани смесью хлороформ — метанол (2 : 1 и 1 : 2) по методу Фолча в модификации Сузуки [12].

Содержание ганглиозидов в верхней водной фазе после ее диализа против дистиллированной воды определяли по количеству N-ацетилнейраминаовой (N-АНК) кислоты, применяя резорциновый метод Свеннерхольма [13]. Содержание галактолипидов (цереброзидов — сульфатитов) в нижней хлороформной фазе определяли колориметрически по количеству галактозы, используя метод Радина [14], но применяя для развития цветной реакции вместо антрона орциновый реактив (0,1 г орцина в охлажденной смеси 20 мл H_2O и 50 мл концентрированной H_2SO_4). Для каждой пробы ставили дополнительный контроль на мутность из-за присутствия других липидов. Для этого аликвот хлороформной фазы обрабатывали так же, как пробу, не добавляя в цветной реактив орцина.

Результаты и обсуждение

Первой задачей нашей работы было воспроизведение экспериментальной модели нейронаралитической формы хронической интоксикации трикрезилфосфатом, в которой путем однократного внутрикожного введения его маслоподобного технического препарата создавали «депо» этого вещества. Постепенное длительное всасывание трикрезилфосфата из «депо»

Таблица 2

Воспроизводимость нейронаралитической формы интоксикации у морских свинок при однократном внутрикожном введении трикрезилфосфата (2,0—2,2 мл/кг)

Общее количество животных	Летальный исход от острой интоксикации	Форма заболевания		
		легкая (+ и ++)	средней тяжести (++ и +++)	тяжелая (+++ и ++++)
62 100%	10 16,1	11 17,7	19 30,6	22 35,5

имитировало хроническую интоксикацию. У всех животных в течение первых 7—8 дней после введения препарата наблюдали признаки острой интоксикации (ухудшение общего состояния, потеря 12—15 % массы, расстройство функций желудочно-кишечного тракта), в результате которой часть животных погибла. В течение последующих 2—3 нед общее состояние животных улучшалось и их масса восстанавливалась. Через 21—25 дней после введения трикрезилфосфата появлялись симптомы его нейронаралитического действия на фоне вторичного резкого снижения массы тела и ухудшения общего состояния. В качестве сравниваемых показателей для оценки степени повреждения миелина были взяты клинические тесты, обозначаемые как «межпальцевое расстояние» и «длина свободно свисающей лапы», отражающие состояние функции нервно-мышечного аппарата дистальных и проксимальных отделов задних конечностей. Степень тяжести демиелинизирующего заболевания у животных оценивали по критериям, разработанным Зильбером [2, 10] и Дворкиным [11], с учетом неврологических симптомов, принятых для оценки степени повреждения миелина при других демиелинизирующих заболеваниях [15].

Данные о воспроизводимости экспериментальной демиелинизации, вызываемой трикрезилфосфатом, представлены в табл. 2.

Учитывая, что мы наблюдали симптомы нейротоксического действия трикрезилфосфата у 84 % животных, причем у 66 % среднюю и тяжелую формы заболевания, следует признать, что воспроизводимость экспериментальной модели нейронаралитической формы хронической интоксикации трикрезилфосфатом при однократном введении очень велика. Кроме того, для биохимических исследований эта модель особенно ценна тем, что дает возможность количественной оценки степени тяжести заболевания.

Для биохимического анализа были выбраны в соответствии с неврологической симптоматикой наиболее повреждаемый пояснично-крестцовый отдел спинного мозга, а также стволовая часть головного мозга у животных со средней и тяжелой формами заболевания.

Результаты определения содержания суммарных галактолипидов (цереброзидов + сульфатидов), представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что хроническая интоксикация приводит к отчетливому снижению (на 22,9 %) содержания этих специфических для миелина компонентов в спинном мозге. Содержание галактолипидов в стволе головного мозга также снижается, но в значительно меньшей степени, чем в спинном мозге (на 9,0 %).

Содержание ганглиозидов, выраженное в микрограммах N-ацетил-нейраминовой кислоты (N-АНК) на 1 г ткани (табл. 4), также снижается

Т а б л и ц а 3

Содержание галактолипидов в головном и спинном мозге морских свинок в норме и при хронической интоксикации трикрезилфосфатом (в мкг галактозы на 1 г ткани)

	Головной мозг (ствол)	Спинной мозг (пояснично-крестцовый отдел)
Контроль (12)	7,8±0,2	11,8±0,5
Трикрезилфосфат (13) (+++ и ++-+-)	7,1±0,2	9,1±0,4
Снижение, %	9,0	22,9
<i>p</i>	<0,02	<0,01

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 4 в скобках дано число животных.

Т а б л и ц а 4

Содержание ганглиозидов в головном и спинном мозге морских свинок в норме и при хронической интоксикации трикрезилфосфатом (в мкг N-АНК/г ткани)

	Головной мозг (ствол)	Спинной мозг (пояснично-крестцовый отдел)
Контроль (11)	293±14	173±12
Трикрезилфосфат (13) (+-+- и +-++-)	297±15	140±9
Снижение, %	---	19,1
<i>p</i>		<0,05

на 19,1 %) в спинном мозге морских свинок со средней и тяжелой формами заболевания, но не изменяется в стволе головного мозга.

Несмотря на то что цереброзиды, по современным представлениям, являются специфическими для миелина липидами [4], их содержание в нервной ткани при демиелинизации, вызываемой ФОС, до сих пор не исследовано. Единственная работа, выполненная на цыплятах [7], показала, что трикрезилфосфат вызывает заметное снижение (на 30 %) количества цереброзидов в седалищном нерве (в расчете на нерв) и снижение содержания в них длинноцепочечных жирных кислот $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ и $C_{24:1}$.

Обнаруженное нами отчетливое снижение содержания галактолипидов в спинном и головном мозге морских свинок при интоксикации трикрезилфосфатом хорошо коррелирует с результатами морфологических исследований, показавших преимущественную локализацию повреждений миелина в спинном мозге [2, 16], а также наличие очагов демиелинизации в некоторых отделах головного мозга, в частности в продолговатом мозге морских свинок [2].

Результаты исследования позволяют предполагать, что выявляемые морфологическим анализом дегенеративные изменения в структуре миелина обусловлены нарушением обмена цереброзидов и сульфатидов — необходимых компонентов для формирования и поддержания структуры миелиновых мембран. Снижение содержания цереброзидов наряду с накоплением эфиров холестерина характерно для демиелинизирующих заболеваний аутоиммунной природы: рассеянного склероза [17, 18], экспериментального аллергического энцефаломиелита [19] и др. Имеются основания полагать, что потеря цереброзидов характерна также для демиелинизации, вызы-

ваемой другими причинами, в частности отравлением ФОС, а возможно, и другими веществами.

Мы исследовали и содержание ганглиозидов, которые локализуются почти исключительно в сером веществе, преимущественно в нейронах, аксонах и синапсах. Ганглиозиды тесно связаны с функциональной деятельностью центральной нервной системы [20], однако они оказались вне поля зрения исследователей, изучающих нейротоксическое действие трикрезилфосфата и других ФОС. Нами обнаружено достоверное снижение содержания ганглиозидов в спинном мозге при интоксикации трикрезилфосфатом, хотя при аллергической демиелинизации подобных изменений мы не нашли [19].

По-видимому, частичную потерю ганглиозидов в спинном мозге можно рассматривать не только как биохимическое доказательство наличия деструктивных изменений в нейрональных структурах, вызываемых трикрезилфосфатом, но и как одну из возможных причин морфологических изменений синаптических и аксональных мембран, описанных у цыплят [21—23], бабуинов [24] и приматов [25].

Принимая во внимание установленный нами ранее факт снижения содержания ганглиозидов в головном мозге кроликов при острой интоксикации ФОС [26], можно сделать вывод о том, что нарушения в обмене ганглиозидов являются важным звеном в патогенезе как острых, так и хронических отравлений различными ФОС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Толгская М. С. Морфологические изменения в нервной системе при профессиональных нейроинтоксикациях. Л., 1967, с. 97.
2. Зильбер Ю. Д. Влияние трикрезилфосфата на миелиновые оболочки и его мембранотоксическое действие. Автореф. дис. докт. М., 1971.
3. Айзенштадт В. С. — «Гиг. труда», 1975, № 3, с. 23.
4. Таранова Н. П. — «Успехи совр. биол.», 1975, № 6, с. 423.
5. Porcellati G., Mastrantonio M. A. — «J. Biochem. (Tokyo)», 1964, v. 13, p. 332.
6. Williams C. H., Johnson H. J., Casterline J. L. — «J. Neurochem.», 1966, v. 13, p. 471.
7. Berry J. F., Cevallos W. H. — Ibid., p. 117.
8. Joel C. D., Moser H. W., Majno G. et al. — Ibid., 1967, v. 14, p. 479.
9. Mogaзаин R., Rosenberg Ph. — «Toxicol. appl. Pharmacol.», 1970, v. 16, p. 461.
10. Зильбер Ю. Д., Коновалов Г. В., Озирская Е. В. и др. — В кн.: Вопросы гигиены труда профпатологии и токсикологии при производстве и использовании фосфорорганических пластификаторов. М., 1973, с. 77.
11. Дворкин Э. А. — Там же, с. 80.
12. Suzuki K. — «J. Neurochem.», 1965, v. 12, p. 629.
13. Svennerholm L. — Ibid., 1963, v. 10, p. 613.
14. Radin N. S., Lavin F. B., Brown J. R. — «J. biol. Chem.», 1955, v. 217, p. 789.
15. Жаботинский Ю. М., Иоффе В. И. Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы. Л., 1975, с. 125.
16. Mumtazuddin A. M. — «Arch. histol. jap.», 1973, v. 35, p. 283.
17. Gerstl B., Eng L. F., Tavaststjerna M. G., et al. — «J. Neurochem.», 1970, v. 15, p. 677.
18. Adams C. W., Hallpike J. F., Bayliss O. B. — Ibid., 1971, v. 18, p. 1479.
19. Таранова Н. П., Кацельсон И. П., Белохвостов А. С., «Вопр. мед. химии», 1975, № 4, с. 385.
20. Туманова С. Ю. — «Успехи совр. биол.», 1976, т. 81, с. 193.
21. Bischoff A. — Acta neuropath. (Berl.), 1970, Bd 15, S. 142.
22. Idem. — In: International Congress Neuropathol. 7th. Proceedings. V. 2. Budapest, 1975, p. 373.
23. Abo-Donia M. B. — «Arch. Toxikol.», 1976, Bd 36, S. 103.
24. Hern E. C., Desmond J. (Ed.) New Developments in Electromyography and Clinical Neurophysiology. V. 2. Basel, 1973, p. 181.
25. Mumtazuddin A. M., Glees P. — «Acta neuropath. (Berl.)», 1971, Bd 19, S. 94.
26. Розенгарт В. И., Таранова Н. П. — «Вопр. мед. химии», 1969, № 4, с. 404.

Поступила 21/III 1977 г.

BRAIN AND SPINAL CORD GLYCOLIPIDS OF GUINEA PIGS AFTER INTOXICATION WITH TRICRESYLPHOSPHATE

N. P. Taranova

Chair of Biochemistry, I. P. Pavlov I Medical School, Leningrad

Experimental neuroparalytic form of chronic intoxication with tricresylphosphate (TCP) was induced in adult guinea pigs by means of single intracutaneous administration of TCP (industrial mixture containing 37% of ortho-isomer) at a dose of 2.0-2.2 ml/kg of body weight.

Moderate and severe forms of the impairment, accompanied by paresis and paralysis of hind extremities was developed in 66.1% of the treated animals. Content of galactolipids (cerebro-sides + sulphatides) and gangliosides was determined in brain stem, lumbar and sacral parts of spinal cord of intact and impaired animals. Content of galactolipids was distinctly decreased in spinal cord (by 22.9%) and in brain stem (by 9.0%). Total gangliosides were decreased by 19.1% in spinal cord, but its content was altered in brain stem. These alterations appear to reflect destructive processes not only in myelin membranes but also in structures of neurones.

УДК 616.633.233'122.6

Г. В. Воскобойников, К. П. Хансон

СОДЕРЖАНИЕ ТИОАМИНОСОЕДИНЕНИЙ В МОЧЕ БОЛЬНЫХ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ С ПОМОЩЬЮ ЙОД-АЗИДНОГО РЕАГЕНТА И ПО РЕАКЦИИ С СЕЛЕНИСТОЙ КИСЛОТОЙ

Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт Министерства здравоохранения СССР, Ленинград

Показано, что использование йод-азидной реакции позволяет количественно оценить концентрацию и величину выведенных тиоаминосоединений с суточной порцией мочи. Найдено, что концентрация тиокетонов в моче онкологических больных составляет 11—15 мкг-экв тиомочевины на 1 мл, что на порядок ниже предела чувствительности реакции с селенистой кислотой. При всех исследованных нами локализациях опухоли ни концентрация тиокетонов в моче, ни величина выведения их за сутки статистически не отличается от соответствующих величин, полученных у больных с неонкологическими заболеваниями. Появление и интенсивность окраски, наблюдающейся в ряде случаев при добавлении к моче селенистой кислоты, по-видимому, определяется не концентрацией в ней тиоаминосоединений, а какими-то иными факторами.

В 1965 г. Коконов предложил новый метод диагностики рака желудка [1]. Сущность его заключается в том, что при добавлении к моче больных раком нескольких капель селенистой кислоты появляется кирпично-красная окраска. В моче здоровых людей либо лиц, страдавших неопухолевыми заболеваниями, это не наблюдается. Появление окраски в моче больных раком желудка обусловлено, по мнению Коконова, повышенным содержанием в ней соединений типа тиомочевины, тиоэтаноламина либо их производных. Эти наблюдения были подтверждены в последующем рядом исследователей [2—6]. По наблюдению Лорман, положительная реакция мочи с селенистой кислотой при опухолях желудочно-кишечного тракта обнаруживается в 98 % случаев [4]. Более того, появление положительной реакции на тиоаминосоединения в ряде случаев предшествует клиническим и рентгенологическим проявлениям заболевания. При других локализациях опухоли автор наблюдала положительную реакцию на тиоаминосоединения в 67,7 % случаев. Однако Косяков обнаружил, что статистически значимое повышение частоты появления положительной реакции мочи на тиоаминосоединения наблюдается только при раке желудка, причем и при этой локализации опухоли в ряде случаев концентрация тиоаминосоединений в моче не отличалась от нормы [2]. Кроме того, по его мнению, цветная реакция мочи с селенистой кислотой обусловлена, очевидно, не только тиоаминосоединениями.

В связи с изложенным представляется, безусловно, важным попытаться количественно оценить содержание тиоаминосоединений в моче онкологических больных и сопоставить эти данные с результатами Коконова, что и явилось задачей данного исследования.

М е т о д и к а

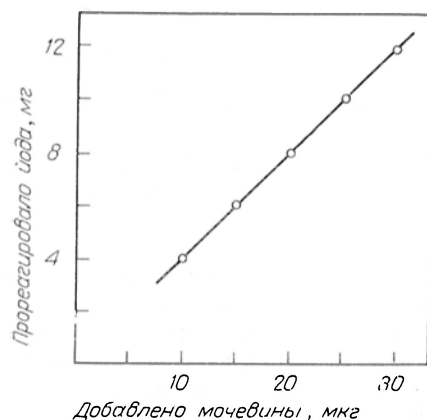
Цветную реакцию мочи с селенистой кислотой на тиоаминосоединения по Коконову проводили, как описано автором [1]. Определение тиоаминосоединений в моче посредством йод-азидного реагента выполняли следующим образом. По 8—10 мл суточной порции мочи

центрифугировали для осаждения взвесей в течение 20 мин при 12 000—15 000 об/мин и в случае необходимости фильтровали через миллиметровый фильтр с величиной пор 0,22 мк для удаления микробных загрязнений. Для анализа отбирали по 1 мл прозрачной мочи, к которой затем добавляли равный объем 11% раствора однозамещенного фосфорнокислого натрия. К полученному раствору приливали последовательно по 1 мл раствора азиды натрия, содержащего 160 мг NaN_3 в 1 мл, и по 1 мл раствора йода, содержащего 16,2 мг йода в 1 мл раствора йодистого калия (35 мг KI в 1 мл). Реакцию проводили в течение 12 мин при комнатной температуре и периодическом встряхивании. Избыток йода оттитровывали затем 0,001 н. гипосульфита натрия, добавляя в среду несколько капель 0,5% раствора крахмала в качестве индикатора. В контрольных опытах вместо мочи использовали 1 мл дистиллированной воды.

Для построения градуировочной кривой использовали растворы тиомочевины в концентрации 10—40 мкг/мл. Расчет содержания тиоаминосоединений в моче производили в микрограмм (миллиграмм) эквивалентах тиомочевины по величине прореагировавшего йода.

Результаты и обсуждение

Определение тиоаминосоединений по методу Коконцова осуществляется путем визуального сопоставления интенсивности развившейся окраски с таковой в стандартных растворах тиомочевины и оценивается в баллах.

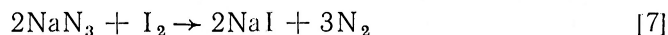


Градуировочная кривая зависимости количества прореагировавшего йода от количества добавленной тиомочевины.

Этот метод является по существу качественным и не позволяет оценить концентрации указанных соединений в весовых либо молярных единицах и рассчитать величину их экскреции с суточной порцией мочи. Для преодоления вышеизложенных затруднений нами предпринята попытка отработать методику количественного определения тиоаминосоединений в моче, основанную на йод-азидной реакции.

Известно, что йод-азидная реакция обладает строгой специфичностью к соединениям серы в форме тиокетон и меркаптанов. Реакция высокочувствительна и позволяет при необходимости произвести раздельное определение тиокетон и меркаптанов [7]. Нижний предел чувствительности йод-азидной реакции к тиомочевине оценивается величиной 0,005 мкг [7].

При наличии в реакционной среде соединений со связью >C=S либо >C-SH реакция азиды натрия с йодом протекает по следующему суммарному уравнению:



Эта реакция ранее была использована для определения содержания в крови цистеина, глутатиона и эрготионеина [8], а также в качестве теста на отравление сероуглеродом [9, 10].

Предварительные опыты показали, что йод-азидная реакция чувствительна к pH среды, однако при стандартной концентрации водородных ионов, обеспечиваемой раствором добавленного фосфорнокислого натрия, наблюдается четкая корреляция между количеством добавленной тиомочевины и величиной прореагировавшего йода (см. рисунок). Эта закономерность сохраняется также и при увеличении концентрации тиомочевины в 2 раза и более (40—80 мкг/мл и более) при соответствующем увеличении количества йод-азидного реагента. Практически представляется рациональ-

ным в случаях с высоким содержанием в пробе тиаминосоединений разводить мочу водой соответственно в 2—4 раза и более, с тем чтобы на титрование опытной пробы использовалось не менее 25—30 % объема гипосульфита натрия, расходуемого на титрование контрольной пробы.

В результате повторных анализов йод-азидным методом растворов, содержащих известные количества тиомочевина, было обнаружено, что в используемом диапазоне концентрации (10 — 40 мкг/мл) средняя ошибка из 3—5 определений не превышает 1—2 %, хотя ошибка отдельного определения иногда достигает 6 — 8 % (табл. 1).

В опытах Косякова было показано, что появление окраски в моче при добавлении к ней селенистой кислоты отчетливо зависит от концентрации солей [2]. В связи с этим нами было проведено определение влияния различных концентраций NaCl на йод-азидную реакцию (табл. 2).

Оказалось, что присутствие в среде NaCl в пределах концентраций, встречающихся в моче людей, не влияет на определение тиаминосоединений посредством йод-азидной реакции. Таким образом, результаты методических опытов подтвердили пригодность йод-азидной реакции для количественного определения содержания тиаминосоединений в моче людей.

В последующих опытах было обследовано 84 человека: 30 человек с неопухолевыми заболеваниями и 54 человека с опухолями различной локализации. Для обследования отбирали больных, не подвергавшихся ранее лечению.

Обследованные больные с неопухолевыми заболеваниями (ишемическая болезнь сердца) были сгруппированы по полу и разделены на две возрастные группы (до 50 и старше 50 лет).

Было найдено, что концентрация тиокетонов в моче неонкологических больных составляет в среднем 11—15 мкг-экв тиомочевина на 1 мл. При этом оказалось, что концентрация тиокетонов в моче мужчин достоверно выше, чем в моче женщин соответствующей возрастной группы (табл. 3).

Выведение тиокетонов с суточной порцией мочи составляло у мужчин в среднем из 15 определений $22,1 \pm 1,1$ мг-экв тиомочевина и оказалось в 2 раза выше, чем у женщин, у которых выведение тиокетонов с мочой за сутки составляло в среднем из 15 определений лишь $13,06 \pm 0,56$ мг-экв тиомочевина. Однако при этом не было обнаружено существенных различий между двумя возрастными группами одного пола ни по концентрации тиокетонов, ни по выведению их с суточной порцией мочи. Эти наблюдения позволили нам в последующем группировать результаты лишь по полу больных и по локализации опухоли.

При определении содержания тиаминосоединений йод-азидным методом в моче больных с различной локализацией опухоли было обнаружено, что концентрация тиокетонов составляет в среднем 11—18 мкг-экв тиомочевина на 1 мл и не отличается существенно от таковой в моче больных с неонкологическими заболеваниями (табл. 4).

Т а б л и ц а 1

Величина ошибки при повторных определениях
тиомочевина йод-азидным методом

Тиомочевина, мкг			
Внесено	10	15	20
Найдено	10,87	15,97	21,47
	10,20	14,97	19,85
	9,32	14,57	19,85
Среднее	10,13	14,83	20,39
%	101,3	98,9	102

Т а б л и ц а 2

Влияние NaCl на йод-азидную реакцию

Внесено тиа- мочевина, мкг	Концентрация NaCl в среде, %	Определено тиамо- чевины, % от добав- ленной
15	0	100,0
15	0,5	101,2
15	1,0	102,0
15	2,0	100,8
15	3,0	103,6

Тем не менее при некоторых локализациях опухоли в моче больных отмечалась положительная реакция с селенистой кислотой по Коконову

Т а б л и ц а 3

Содержание тиоаминосоединений в моче больных ишемической болезнью сердца ($M \pm m$)

Пол	Возраст, годы	Число обследованных	Содержание тиокетоноп, мкг-экв тиомочевины	
			на 1 мл	на диурез
М.	До 50	8	15,15 \pm 1,15	20,08 \pm 0,69
Ж.		10	11,00 \pm 0,80	13,09 \pm 0,69
			2,96	8,02
М.	Старше 50	7	15,21 \pm 1,00	24,44 \pm 1,56
Ж.		5	11,30 \pm 0,81	12,99 \pm 0,93
			3,05	6,58

Т а б л и ц а 4

Содержание тиоаминосоединений в моче больных с онкологическими и неонкологическими заболеваниями при определении с помощью йод-азидной реакции и по методу Коконова ($M \pm m$)

Диагноз	Пол	Число обследованных	Концентрация тиокетоноп, мкг/экв тиомочевины на 1 мл мочи	Число больных с положительной реакцией по Коконову	Выведение тиокетоноп за сутки, мкг-экв тиомочевины
Ишемическая болезнь сердца	М.	15	15,2 \pm 0,74	2	22,11 \pm 1,1
	Ж.	15	11,1 \pm 0,91	1	13,06 \pm 0,56
Рак желудка	М.	8	16,7 \pm 2,26	5	14,67 \pm 1,54
	Ж.	4	11,58 \pm 1,85	3	9,31 \pm 0,51
Рак прямой кишки	М.	12	13,64 \pm 1,67	3	13,15 \pm 1,16
	Ж.	3	18,93 \pm 9,39	1	12,88 \pm 5,09
Рак толстой кишки	М.	4	17,22 \pm 3,31	2	16,54 \pm 2,80
	Ж.	4	8,92 \pm 2,30	0	10,19 \pm 1,91
Рак пищевода	М.	4	11,05 \pm 0,70	1	14,92 \pm 2,53
	Ж.	1	—	0	—
Рак легких	М.	6	13,06 \pm 3,40	1	18,85 \pm 2,46
	Ж.	2	—	0	—
Лимфогранулематоз	М.	5	15,14 \pm 2,03	1	15,13 \pm 0,78
	Ж.	1	—	0	—

значительно в большем проценте случаев, чем в моче неонкологических больных. В частности, при раке желудка положительная реакция по Коконову обнаружена у 8 из 12 обследованных больных, т. е. в 67 % случаев. В то же время при других локализациях рака желудочно-кишечного тракта частота появления окраски при добавлении к моче селенистой кислоты оказалась значительно ниже и не превышала 20—25 %. Так, при раке прямой кишки реакция оказалась положительной в 4 из 15 случаев, при раке толстой кишки — в 2 из 8, при раке пищевода — в 1 из 5.

Достаточно очевидно, что при оценке содержания тиоаминосоединений в моче посредством интенсивности развивающейся окраски по Коконову было невозможно учесть величину экскреции этих соединений за сутки. Использование для этих же целей йод-азидного реагента позволило показать, что экскреция тиокетоноп с суточной порцией мочи при ряде локализаций опухоли оказалась даже ниже, чем в контрольной группе больных, и только при раке легких и толстой кишки достигала такого же уровня, как и при ишемической болезни сердца.

Таким образом, полученные в наших опытах данные не дают основания думать ни о повышении концентрации тиоаминосоединений в моче онкологических больных, ни об увеличении экскреции этих соединений. В то же время мы также наблюдали более высокую частоту положительной реакции

мочи с селенистой кислотой по Коконову при опухолях желудка по сравнению с мочой больных с неонкологическими заболеваниями, что согласуется с наблюдениями других авторов [1—6].

Сопоставление результатов двух методов исследования (табл. 5) дает основание считать, что появление и интенсивность окраски при добавлении к моче селенистой кислоты определяются, по-видимому, какими-то иными факторами, а не концентрацией в ней тиаминосоединений. Аналогичное сомнение ранее было высказано также Косяковым [2]. В самом деле, данные табл. 5 показывают, что при всех исследованных локализациях опухоли наблюдаются случаи положительной реакции мочи с селенистой кислотой при сравнительно невысокой концентрации в ней тиокетонов, определяемых по йод-азидному методу, и, напротив, — отрицательная реакция при более высокой концентрации тиокетонов в моче.

Таким образом, проведенные опыты показали пригодность йод-азидной реакции для количественного определения содержания тиаминосоединений в моче. Метод определения тиокетонов и меркаптанов в моче посредством йод-азидной реакции является высокочувствительным и специфичным для указанных соединений. Более того, при необходимости возможно раздельное определение тиокетонов и меркаптанов, основанное на том, что предварительное внесение в пробы раствора йода вызывает превращение сульфгидрильных групп в дисульфиды, которые не инициируют йод-азидную реакцию [7].

Т а б л и ц а 5

Сопоставление содержания тиокетонов в моче онкологических больных при определении с помощью йод-азидной реакции и по методу Коконова

Диагноз	Концентрация тиокетонов, мкг-экв тиомочевина на 1 мл мочи	Реакция по Коконову
Рак желудка	20,3	++
	15,3	+++
	16,6	—
Рак прямой кишки	9,8	++
	11,7	++
	23,5	—
Рак пищевода	20,6	—
	10,9	++
	12,4	—
Рак толстой кишки	12,7	+++
	18,8	—
Рак легкого	17,5	++
	18,3	—

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Коконов Т. М. — «Лаб. дело», 1965, № 5, с. 273—276.
2. Косяков К. С. — Там же, 1971, № 7, с. 417—419.
3. Олифсон Л. Е., Михайлова Н. Б., Кирбятъева О. К. — Там же, с. 419—420.
4. Лорман Т. Б. — Труды 1-го съезда онкологов РСФСР. Т. 1. Уфа, 1973, с. 148—150.
5. Лорман Т. Б. — «Лаб. дело», 1975, № 3, с. 162—164.
6. Резникова С. Г., Леонтьева С. К., Брызгалова В. П. и др. — В кн.: Ферменты в клинических и экспериментальных исследованиях. Омск, 1975, с. 57—77.
7. Файгель Ф. Капельный анализ органических веществ. М., 1962, с. 308—333.
8. Kurzawa I., Kurzawa L. — «Chem. Analyt.», 1974, 19, p. 931—939.
9. Djuric D., Surduckin N., Berkes J. — «Brit. J. industr. Med.», 1965, v. 22, p. 321—323.
10. Fournier E., Petit L., Lescorsier A. — «Europ. J. Toxicol.», 1971, v. 3, p. 337—340.

Поступила 24/III 1977 г.

USE OF IODINE-AZIDE AND SELENOUS ACID REAGENTS FOR ESTIMATION OF THIOAMINES CONTENT IN URINE OF PATIENT'S

G. V. Voskoboinikov, K. P. Hanson

Laboratory of Biochemistry, Central Research Institute of Radiology, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

Iodine-azide reagent enabled to evaluate quantitatively content of thioamines excreted within a day. Concentration of thioketones in urine of patients was 11-15 µg/eqv of thiourea

per 1 ml, at the same time their excretion within a day accounted for 13.06 ± 0.56 mg/eqv in women and 22.11 ± 1.1 mg/eqv in men. Neither concentration of thioketones in urine nor their excretion in patients with various tumors studied were distinct from these patterns in urine of non-oncologic patients. Comparison of these two methods suggests that development of color on addition of selenous acid to urine is not due to reaction with thioamines present but to interaction with other unknown substances.

УДК 612.627-06:612.621.31

Н. Д. Фанченко, Л. С. Минина, Р. Н. Щедрина

ОСОБЕННОСТИ ЭСТРАДИОЛ-РЕЦЕПТОРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ЦИТОЗОЛЕ ФАЛЛОПИЕВЫХ ТРУБ ЧЕЛОВЕКА

Всесоюзный научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии, Москва

Изучены физико-химические параметры эстрадиол-рецепторного взаимодействия в цитозоле фаллопиевых труб человека (константы скорости ассоциации и диссоциации, полупериод жизни эстрадиол-рецепторного комплекса, константа равновесия, величина изменения свободной энергии связи), а также рассчитано количество цитоплазматических связывающих мест на клетку.

Охарактеризована специфичность взаимодействия рецепторной системы цитозоля маточных труб с 13 соединениями. Показано, что стероид-рецепторное взаимодействие определяется в основном наличием гидроксильных групп в 3-м фенольном и 17 β -положениях. Ближайшее окружение этих гидроксильных групп также играет существенную роль в степени проявления сродства стероидов к исследуемой системе.

Для ряда органов-мишеней человека, таких, как матка и молочные железы, в литературе имеется фактический материал по характеристике эстрадиол-рецепторной системы [1—6]. В то же время сведения об эстрадиол-рецепторной системе маточных труб человека ограничены данными о суммарном количестве рецептирующих мест и кинетических параметрах процесса диссоциации стероид-рецепторного комплекса [7—9]. Четкое представление о свойствах эстрадиол-рецепторного взаимодействия в фаллопиевых трубах как одного из звеньев репродуктивной системы необходимо для понимания закономерностей функционирования этой системы и подходов к путям ее коррекции в патологических случаях.

Настоящая работа посвящена изучению кинетических, термодинамических параметров и специфичности эстрадиол-рецепторного взаимодействия цитозоля фаллопиевых труб человека.

Методика

Различные сегменты маточных труб, полученные при гистерэктомии по поводу миомы матки от 24 женщин (в возрасте 37—59 лет), не содержали выявляемых макроскопически патологически измененных участков. Ткань после иссечения немедленно помещали на лед, снимали серозную оболочку и подвергали мягкому гомогенизированию в стеклянном гомогенизаторе с 4-кратным объемом холодного буфера. Гомогенат фильтровали через капроновый фильтр и центрифугировали при 105 000 g в течение 1 ч. Цитозоль хранили в присутствии 2 мМ меркаптоэтанола при -30°C . Осадок использовали для определения ДНК [10].

В опытах использовали следующие реактивы: 2,4,6,7- ^3H -эстрадиол-17 β с удельной активностью 100 Ки/ммоль, фирма «Amersham»; эстрадиол-17 β , диэтилстильбэстрол, синэстрол, эстрон, эстриол, 17 α -этинилэстрадиол фирма «Calbiochem»; 3-бензоат эстрадиола, 17 β -валерианат эстрадиола, 2Вг- и 4Вг-эстрадиолы, 17- и 3-дезоксистероиды, 3-дезоксистероиды были любезно предоставлены канд. хим. наук Г. С. Гриненко и канд. хим. наук К. К. Пивничкиным. Буфер трис-HCl, pH 7,4, содержащий 1 мМ ЭДТА и 0,25 М сахарозу. Уголь активированный Norit A, многократно промытый водой, высушенный 24 ч при 100°C ; использовали 0,25% суспензию в буфере, содержащем 0,1% желатина. Сцинтиллятор: 5 г ППО, 0,5 г ПОПОП в 1 л толуола. Количество радиоактивности в пробах (в имп/мин) пресчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике Tricarb с эффективностью счета 54%.

Определение констант скорости диссоциации (k_{-1}) проводили по методу [11] с использованием избытка немеченого гормона (см. рисунок). Полупериод жизни комплекса опре-

деляли по формуле $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}}$ для реакций первого порядка [12]. Для опреде-

ления равновесной константы ассоциации ($K_{асс}$) эстрадиола с выделенной рецепторной системой использовали принцип насыщающего анализа. Расчет $K_{асс}$ и концентрации связывающих мест производили по методу Скэтчарда [13]. Диапазон концентраций меченого эстрадиола—0,05—0,75 пМ. Разделение свободной и связанной фракций стероидов осуществляли адсорбцией на суспензии угля. Для учета неспецифического связывания параллельно с ^3H -эстрадиолом использовали 100-кратный избыток немеченого эстрадиола [14]. Для расчета констант скорости ассоциации (k_{+1}) использовали общепринятую формулу для обратимых реакций $K_{асс} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}}$.

Изменение свободной энергии связи эстрадиола с рецептором (ΔG) рассчитывали, исходя из второго закона термодинамики $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ и следствия из него $\Delta G = -RT \ln K_{асс}$. Определение относительного сродства анализируемых стероидов проводили по описанному методу [15] с использованием кривых вытеснения эстрадиола и двух концентраций исследуемого препарата. Для вычисления молярных процентов сродства по отношению к эстрадиолу ответ на внесенную дозу исследуемого соединения находили по спрямленной стандартной кривой, построенной в логарифмических координатах [16].

Статистическую обработку результатов и расчеты физико-химических параметров проводили на программируемом калькуляторе Wang 720C. Нами была разработана специальная программа для определения параметров графика Скэтчарда и клеточного содержания рецепторов с одновременной статистической обработкой на основе регрессионного анализа. Эта программа не требует никакой предварительной обработки результатов, в качестве исходных данных в ней использованы сцинтилляционный счет, удельная активность меченого компонента, эффективность счета, объем реакционной смеси и концентрация ДНК.

Равновесные $K_{асс}$ процесса связывания анализируемых препаратов с эстрадиол-рецепторной системой вычисляли по методу [17] с применением программы, разработанной в нашей лаборатории, используя в качестве исходных данных $K_{асс}$ эстрадиола, внесенную дозу меченого эстрадиола, количество связанного ^3H -эстрадиола, оставшегося после вытеснения исследуемым соединением и молярный процент сродства анализируемого препарата.

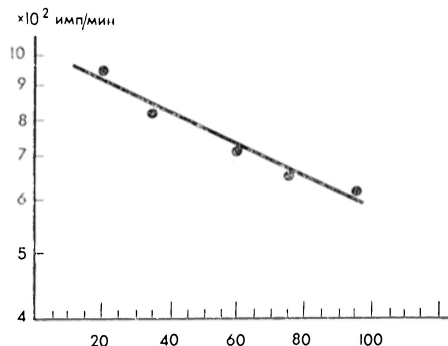
Для вычисления k_{-1} с помощью регрессионного анализа и обычной статистической обработки использовали модификации соответствующих стандартных программ для Wang 720C.

Результаты и обсуждение

1. Физико-химические характеристики эстрадиол-рецепторного цитозоля труб человека.

Анализ процесса диссоциации эстрадиол-рецепторного комплекса цитозоля маточных труб был проведен при инкубации ^3H -эстрадиол-рецепторного комплекса с избытком немеченого эстрадиола при 30°C и 0°C в течение 2 ч. Комплекс был стабилен в равновесных условиях в течение инкубации. Полученные в данном исследовании величины K^{-1} и $T_{1/2}$ ($10,123 \pm 0,014 \times 10^{-3} \text{ C}^{-1}$ и 97 мин соответственно) эстрадиол-рецепторного комплекса маточных труб человека существенно отличаются от величин, представленных в единственной посвященной этому вопросу публикации [8]. Параметры, полученные нами, свидетельствуют о большей прочности эстрадиол-рецепторного комплекса цитозоля труб, выделенного из использованных нами тканей. Представляется, что разница литературных и полученных нами данных связана с особенностями использованной ткани (степень поражения труб при данном виде патологии). При 0°C диссоциация эстрадиол-рецепторного комплекса не обнаружена.

Значения $K_{асс}$, k_{+1} , ΔG , Q , полученные в опыте с инкубацией при 30°C в течение 7 ч, составляли соответственно $[0,563 \pm 0,127] \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$; $0,692 \cdot 10^5 \text{ C}^{-1} \text{ M}^{-1}$; 51 кдж/моль; 2900 связывающих мест на клетку.



Типичная кривая диссоциации ^3H -эстрадиол-рецепторного комплекса цитозоля фаллопиевых труб человека.

По оси абсцисс — время t (в мин); по оси ординат — количество ^3H -эстрадиола (в имп/мин).

Показано [8], что установление равновесия в системе эстрадиол — рецептор цитозоля маточных труб человека происходит через 4 ч. Для исследования систем, содержащих, кроме эстрадиола, соединения с неизвестной скоростью взаимодействия с рецепторами, требуется заведомо большее время. Однако после 8 ч инкубации отмечается заметная деградация комплекса, в связи с чем была выбрана 7-часовая инкубация для изучения систем в состоянии равновесия.

В литературе отсутствуют термодинамические параметры эстрадиол-рецепторного взаимодействия фаллопиевых труб человека. Величина K_{acc} аналогичного комплекса матки человека [18, 19] на порядок выше аналогичных величин, полученных нами для труб.

Характеристика сродства ряда стероидов к эстрадиол-рецепторной системе цитозоля фаллопиевых труб человека

Соединение	K_{acc}, M^{-1}	Сродство, мол %
Этинил-эстрадиол	$(0,929 \pm 0,093) \times 10^9$	$160,0 \pm 15,2$
Эстрадиол	$(0,563 \pm 0,127) \times 10^9$	100
Диэтилстильбэстрол	$(0,266 \pm 0,026) \times 10^9$	$49,0 \pm 4,0$
Синэстрол	$(0,136 \pm 0,026) \times 10^9$	$25,4 \pm 4,9$
Бензоат эстрадиола	$(0,526 \pm 0,154) \times 10^8$	$9,73 \pm 2,84$
Эстриол	$(0,468 \pm 0,032) \times 10^8$	$8,61 \pm 0,57$
Валерианат эстрадиола	$(0,104 \pm 0,005) \times 10^8$	$1,96 \pm 0,07$
Эстрон	$(0,929 \pm 0,070) \times 10^7$	$1,74 \pm 0,12$
2Вг-эстрадиол	$(0,345 \pm 0,043) \times 10^7$	$0,65 \pm 0,08$
4Вг-эстрадиол	$(0,281 \pm 0,082) \times 10^7$	$0,536 \pm 0,156$
17-дезоксистеродиол	$(0,228 \pm 0,043) \times 10^7$	$0,430 \pm 0,082$
3-дезоксистеродиол	$(0,189 \pm 0,053) \times 10^7$	$0,370 \pm 0,096$
3-дезоксистерон	$(0,14 \pm 0,01) \times 10^6$	$0,028 \pm 0,002$

Величина ΔG взаимодействия эстрадиола с рецепторной системой труб свидетельствует, что определяющими в образовании комплекса являются водородные связи. Это согласуется с литературными данными об определяющих связях стероид-рецепторного взаимодействия [21].

При определении содержания рецепторов в клетке были получены данные (см. табл. 1), соответствующие литературным [7—9].

2. Специфичность эстроген-чувствительной системы цитозоля маточных труб человека.

При исследовании сродства широкого ряда препаратов к рецепторной системе матки человека [20] были отобраны 13 наиболее активных соединений и проанализировано их сродство к рецепторной системе фаллопиевых труб. Результаты, выраженные в виде молярных процентов сродства по отношению к сродству эстрадиола и в величинах K_{acc} анализируемых соединений с исследуемой системой представлены в таблице.

Полученные данные позволяют высказать определенные соображения о закономерностях взаимодействия эстрогенов с эстроген-рецепторной системой фаллопиевых труб человека. Стероид-рецепторное взаимодействие определяется в основном наличием гидроксильных групп в 3-м фенольном и 17β-положениях. Модификация стероидов по этим положениям меняет стероид-рецепторное взаимодействие, причем степень изменения диктуется характером модификации. Так, окисление 17β-ОН группы или ее этерификация валериановой кислотой резко понижает сродство стероида к рецепторной системе (соединения 7,8; см. табл. 2), однако это снижение значительно меньше, чем при удалении гидроксильной группы из положения 17 (соединение 11). Удаление гидроксильной группы из 3-го фенольного положения приводит к значительно большему подавлению сродства стероидного препарата к исследуемой системе, чем этерификация бензойной кислотой (соединения 12, 5). О значимости обоих гидроксильных групп для стероид-рецепторного взаимодей-

ствия убедительно свидетельствует минимальное сродство к рецепторной системе маточных труб человека 3-дезоксистерона (соединение 13).

Следует обратить внимание на то, что ближайшее окружение гидроксильных в положениях 17 и 3 играет существенную роль в степени проявления сродства стероидов к исследуемой системе. Так, гидроксильное в положении 16 α , бромирование положений 2 и 4 снижает стероид-рецепторное взаимодействие, в то время как введение этильной группы в 17 α -положение приводит к резкому увеличению сродства стероида к исследуемой системе (соединения 6, 9, 10, 1). По всей видимости, значимость изменения ближайшего окружения 3-го фенольного и 17 β -гидроксильных неравнозначна, в то время как места мета-бромирования кольца А для стероид-рецепторного взаимодействия, вероятно, равноценны.

Исследованные нестероидные соединения [3, 4] обладают относительно высоким сродством к рецепторной системе фаллопиевых труб, более выраженным при применении диэтилстильбэстрола.

Сравнить полученные нами данные с опубликованными другими авторами не представляется возможным, поскольку в доступной нам литературе отсутствуют характеристики сродства эстроген-чувствительной системы цитозоля маточных труб человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Evans L. H., Martin J. D., Hähnle R. — «I. clin Endocr.», 1974, v. 38, p. 23.
2. Notides A. C., Hamilton D. E., Aher H. E. — «J. biol. Chem.», 1975, v. 250, p. 3945.
3. Satajczahanel T., Hähnle R. — «J. Steroid. Biochem.», 1976, v. 7, p. 185.
4. Fishman J. H. — «J. clin. Endocr.», 1975, v. 40, p. 724.
5. Sakai F., Saez S. — «Steroids», 1976, v. 27, p. 99.
6. Leung B. S., Jack W. M., Reiney C. G. — «J. Steroid. Biochem.», 1976, v. 7, p. 89.
7. Flickinger G. L., Muechler E. K., Mikhail G. — «Fertil. a. Steril.», 1974, v. 25, p. 900.
8. Robertson D. M., Landgren B. M., Guerrero R. — «Acta endocr. (Kbh.)», 1975, v. 80, p. 705.
9. Robertson D. M. et al. — «J. Steroid. Biochem.», 1975, v. 6, p. 511.
10. Burton K. — «Biochem. J.», 1956, v. 62, p. 315.
11. Mester J., Robertson D. M. — «Biochim. biophys. Acta», 1971, v. 230, p. 543.
12. Best-Belpomme M., Frier J., Erdjoes T. — «Europ. J. Biochem.», 1970, v. 17, p. 425.
13. Scatchard G. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1949, v. 51, p. 660.
14. Hsueh A. J. W., Peck E. J., And J. R. et al. — «Steroids», 1974, v. 24, p. 599.
15. Щедрина Р. Н., Стурчак С. В., Боброва Е. Г. и др. — «Бюлл. exper. биол.», 1976, № 8, с. 989.
16. Rodbard D., Bridson W., Raybord P. L. — «J. Lab. clin. Med.», 1969, v. 74, p. 770.
17. Ekins R. P. et al. — In: Hayes R. L. et al. (Eds). Radioisotopes in Medicine: in Vitro Studies. Oak Ridge, 1968, p. 59.
18. Robertson D. M., Mester J., Beilby J. et al. — «Acta endocr. (Kbh.)», 1971, v. 68, p. 534.
19. Hähnle R. — «Steroids», 1971, v. 17, p. 105.
20. Персианинов Л. С., Стурчак С. В., Коколина В. Ф. — В кн.: Современные методы исследования в гинекологии. М., 1976, с. 8.
21. King R. J. B., Mainwaring W. I. P. — In: Steroid-cell interactions, London, 1974, p. 7.

Поступила 30/III 1977 г.

CHARACTERISTICS OF ESTRADIOL-RECEPTOR INTERACTION IN CYTOSOLE OF HUMAN FALLOPIAN TUBES

N. D. Fanchenko, L. S. Minina, R. N. Schedrina

Institute of Obstetrics and Gynaecology, Moscow

Physico-chemical parameters (the rate constants of association and dissociation, half life of the estradiol-receptor complex, equilibrium constant, alteration of free energy of the bond) of estradiol-receptor interaction were studied in cytosole of human Fallopian tubes. Amounts of the cytoplasmic binding sites per cell were estimated. Specific interaction of the tube cytosole receptor system with 13 substances was examined. Steroid-receptor reaction has mainly been determined by presence of hydroxyl groups in the 3-d phenol and 17 β -positions. Nearest surroundings at the hydroxyls was also important for manifestation of the affinity of the steroids to the system studied.

Н. П. Ларионов, Н. М. Кротенко

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АТФ-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ АКТОМИОЗИНА И АКТИВНОСТИ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ

Красноярский медицинский институт

В постнатальном периоде резко увеличивается АТФ-азная активность актомиозина и активность ферментов гликогенолиза. Выявлена высокая степень корреляции между АТФ-азной активностью актомиозина, фосфофруктокиназой, фосфогексоизомеразой, енолазой, пируваткиназой, лактатдегидрогеназой и «связанной» фракцией альдолазы. При изучении кинетических характеристик фосфофруктокиназы (K_m и коэффициент Хилла) не обнаружено их изменений в постнатальном периоде. Предполагается, что в процессе становления сократительной функции важная роль принадлежит возникновению структурных комплексов между сократительными белками и гликолитическими ферментами.

В предыдущей работе [1] было показано, что в период становления сократительной функции скелетных мышц, который у крыс приходится на 2-ю декаду постнатального периода, резко увеличивается активность ферментов гликогенолиза. Это соответствует представлению, что гликолитический механизм выполняет специальную роль в энергетическом обеспечении сократительной функции [2, 3]. В настоящее время имеются убедительные доказательства существования в клетке адсорбционных комплексов между сократительными белками и ферментами гликолиза, а также их важной роли в процессе сокращения [4, 5]. Показано также наличие высокой степени корреляции между Mg^{2+} -АТФ-азной активностью актомиозина и активностью фосфофруктокиназы в сердечной и скелетной мышцах, причем эта корреляция не нарушалась при длительной тренировке, несмотря на противоположные изменения АТФ-азной активности актомиозина в различных типах мышц [6]. В связи с этим представлялось важным сопоставить активность гликолитических ферментов с Mg^{2+} -АТФ-азной активностью актомиозина в постнатальном периоде развития, поскольку выявление высокой степени корреляции в момент становления сократительной функции подтвердило бы наличие структурной взаимосвязи сократительного и гликолитического комплексов.

М е т о д и к а

В работе использованы белые крысы, которых брали в опыт непосредственно после рождения, 10-, 15- и 30-дневные животные, а также взрослые крысы весом около 200 г. Животных забивали декапитацией, мышцы бедра и голени отмыкали от крови в холодной 0,25 М сахарозе и использовали для выделения актомиозина и определения активности гликолитических ферментов. Для выделения актомиозина в группе новорожденных объединяли мышцы от 18 животных, в группах 10- и 15-дневных крыс — от 3 животных, а в группе 30-дневных — от 2 животных. Навески ткани гомогенизировали в среде выделения [7]. Выделение актомиозина и определение его Mg^{2+} -АТФ-азной активности проводили по описанному методу [6], активность рассчитывали в микромолях фосфора на 1 мг белка в минуту. Фосфор определяли колориметрически [8], белок — по Лоури [9]. Методы экстракции гликолитических ферментов и определения их активности описаны ранее [1, 10]. Активность рассчитывали в микромолях на 1 г ткани в минуту. Для определения K_m по двум субстратам: АТФ и фруктозо-6-фосфату, а также коэффициента Хилла для фосфофруктокиназы использованы графические методы [11]. Для выделения альдолазы, которая характеризуется высоким сродством к сократительным белкам, использован метод многократной экстракции растворами с низкой и высокой ионной силой [4] в модификации [1]. В качестве растворов с низкой ионной силой использовали 0,3 М сахарозу и 0,002 М ЭДТА pH 7,2. Активность, определяемую в этой фракции, обозначали как «растворимую». Альдолазу, адсорбированную на клеточных структурах и не экстрагируемую раствором с низкой ионной силой, выделяли 0,1 М фосфатным буфером pH 7,2. Активность этой фракции обозначали как «связанную». Коэффициент корреляции (r) и достоверность корреляции (P) рассчитывали общепринятыми методами [12].

Результаты и обсуждение

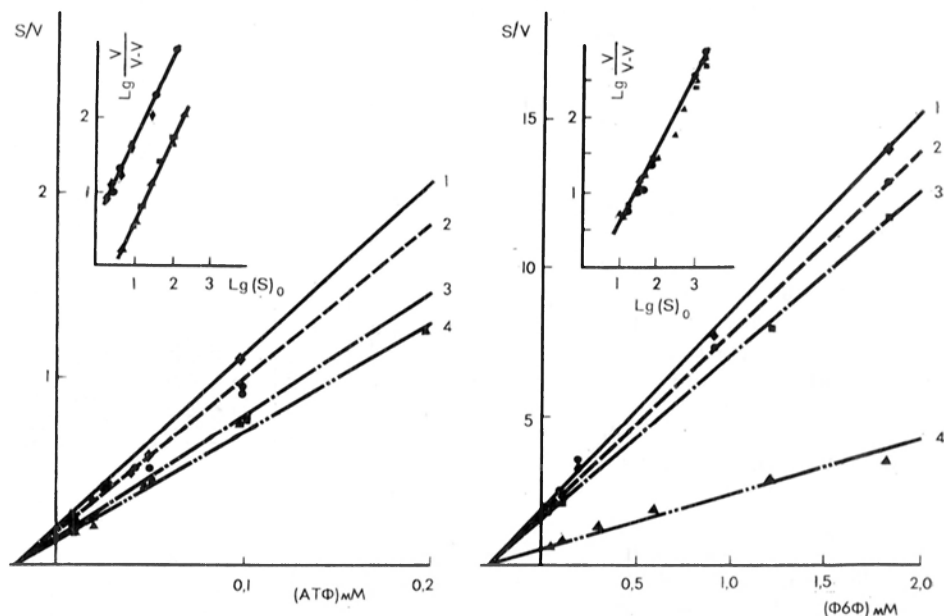
Данные об изменении активности гликолитических ферментов и Mg^{2+} -АТФ-азы актомиозина в первые дни после рождения представлены в таблице. Можно видеть, что активность Mg^{2+} -АТФ-азы и всех гликолитических ферментов, за исключением гексокиназы, многократно возрастает, причем максимально она повышается в период становления сократительной функции— во 2-ю декаду постнатального периода развития. Активность гексокиназы в отличие от других гликолитических ферментов не увеличивается после рождения, это позволяет исключить ее из комплекса ферментов, связанных с сократительным комплексом и ответственных за срочное образование энергии. Группу коррелирующих с АТФ-азой ферментов, по-видимому, можно увеличить, поскольку ферменты центрального участка гликолитического пути, начиная с триозофосфатдегидрогеназы и кончая енолазой, синтезируются в эквимолярных соотношениях. Складывается впечатление, что формирование гликолитического механизма в онтогенезе согласовано с развитием сократительного аппарата.

Высокая степень корреляции может быть достигнута, например, при адсорбционном взаимодействии актомиозина и мультиэнзимного гликолитического комплекса. Такое предположение подтверждают данные Петте о наличии в клетке адсорбционного комплекса между актомиозином и гликолитическими ферментами и возможности образования таких комплексов *in vitro* [4]. Использование растворов с низкой и высокой ионной силой позволяет выделять из мышечного гомогената фракции ферментов, различающихся по степени взаимодействия с клеточными структурами: «растворимую» и «связанную». Показано, что порог ионной силы, при котором «связанная» альдолаза десорбируется из искусственного комплекса с F-актином *in vitro* и освобождается из гомогената, одинаков, что дало основание предположить существование таких комплексов *in vivo* и их важную физиологическую роль. В пользу этого свидетельствует обнаруженное нами 3-кратное увеличение степени связывания альдолазы в постнатальном периоде развития [1].

Изменения активности Mg^{2+} -АТФ-азы актомиозина и гликолитических ферментов в постнатальном периоде развития (в мкмоль на 1 г ткани в 1 мин)

Фермент	Возраст крыс					r	P
	новорожденные	10-Дневные	15-Дневные	30-Дневные	взрослые		
Mg^{2+} -АТФ-аза актомиозина	2,35	14,6	21,7	54,6	78,0	0,176	—
Гексокиназа	$1,60 \pm 0,32$	$1,52 \pm 0,24$	$1,83 \pm 0,38$	$1,83 \pm 0,20$	$1,88 \pm 0,32$	0,176	—
Фосфокиназа	$0,590 \pm 0,007$	$1,37 \pm 0,012$	$1,88 \pm 0,015$	$1,98 \pm 0,013$	$2,70 \pm 0,035$	0,918	0,05
Фосфокреатинкиназа	$17,7 \pm 1,88$	$23,2 \pm 4,38$	$32,6 \pm 4,76$	$51,1 \pm 6,21$	$69,1 \pm 9,29$	0,998	<0,01
Альдолаза:	$1,37 \pm 0,42$	$2,37 \pm 0,33$	$7,45 \pm 1,08$	$19,5 \pm 3,06$	$26,8 \pm 4,32$	0,996	<0,01
«растворимая»	$1,50 \pm 0,20$	$1,94 \pm 0,18$	$3,94 \pm 0,29$	$3,39 \pm 0,33$	$7,16 \pm 0,51$	0,870	—
«связанная»	$1,45 \pm 0,18$	$3,70 \pm 0,39$	$7,51 \pm 0,66$	$11,6 \pm 0,65$	$18,8 \pm 1,95$	0,988	<0,01
Енолаза	$2,82 \pm 0,30$	$5,43 \pm 1,06$	$9,13 \pm 1,47$	$15,6 \pm 1,50$	$28,2 \pm 3,82$	0,986	<0,01
Пируваткиназа	$11,3 \pm 1,52$	$21,6 \pm 4,40$	$25,4 \pm 5,13$	$49,9 \pm 3,75$	$111 \pm 8,10$	0,950	<0,01
Лактатдегидрогеназа	$30,3 \pm 3,87$	$38,8 \pm 3,22$	$53,5 \pm 6,83$	$111 \pm 15,6$	$242 \pm 35,42$	0,962	<0,01

Можно предположить два варианта распределения гликолитических ферментов в клетке: 1-й — «связанная» и «растворимая» фракции находятся в состоянии динамического равновесия; 2-й — «связанная» и «растворимая» фракции являются представителями отделов клетки, которые могут функционировать раздельно. Очевидно, в условиях динамического равновесия «растворимая» и «связанная» фракции альдолазы должны в равной степени коррелировать с Mg^{2+} -АТФ-азной активностью актомиозина, несмотря на изменения степени связывания. Однако из материалов таблицы следует, что коэффициент корреляции между Mg^{2+} -АТФ-азой актомиозина и альдолазой достаточно высок только для «связанной» фракции фермента. Корреляция «растворимой» фракции альдолазы с Mg^{2+} -АТФ-азой актомиозина недостоверна. Полученный результат позволяет думать, что



Определение K_m и коэффициента Хилла фосфофруктокиназы развивающейся скелетной мышцы.

1 (ромбы) — новорожденные; 2 (кружки) — 10-дневные крысы; 3 (квадраты) — красная мышца; 4 (треугольники) — белая мышца.

высокая степень корреляции между АТФ-азной активностью актомиозина для большинства гликолитических ферментов обусловлена их тесным функциональным взаимодействием, которое необходимо в процессе срочного обеспечения энергией сократительной функции. В основе этого взаимодействия лежит адсорбция гликолитического комплекса на сократительных белках.

Резкое увеличение связывания альдолазы с клеточными структурами в постнатальном периоде развития, по-видимому, обусловлено изменением физико-химических свойств сократительных белков. Об этом свидетельствует многократное увеличение Mg^{2+} -АТФ-азной активности актомиозина в скелетной мышце после рождения. Весьма вероятно, что механизм, обуславливающий увеличение степени связывания гликолитических ферментов и прирост АТФ-азной активности актомиозина, один и тот же и связан с увеличением доли Н-меромиозина в сократительном комплексе.

А priori невозможно исключить изменения в онтогенезе структуры самих гликолитических ферментов, в связи с чем на следующем этапе были исследованы основные кинетические параметры фосфофруктокиназы в постнатальном периоде развития. Выбор фермента для этой цели был обусловлен его важным значением для регуляции всей гликолитической цепи,

а также тем, что его кинетические характеристики хорошо изучены [14]. Результаты определения K_m и коэффициента Хилла [10] представлены на рисунке, из которого следует, что основные характеристики фосфофруктокиназы, определяющие ее сродство к субстрату и чувствительность к аллостерическим эффекторам, не меняются в развивающейся скелетной мышце. Более того, не удается обнаружить изменений свойств фосфофруктокиназы и в процессе дифференцировки мышцы на красный и белый типы.

Со времени установления центральной роли АТФ в энергетике мышцы [15, 16] возникло представление, что гликолиз включается эпизодически в условиях, когда энергия окислительного фосфорилирования оказывается недостаточной для восполнения запасов АТФ. В оценке удельной роли окислительного фосфорилирования и гликолиза особое значение имел тот факт, что при окислении 1 моль глюкозы образуется более 30 моль АТФ, а в процессе гликолиза — лишь 2 моль. Столь значительное различие в эффективности аэробного и анаэробного пути синтеза АТФ отводило гликолизу второстепенную роль. При этом от внимания исследователей ускользало, что гликолиз благодаря возможности структурной связи с сократительными белками обладает преимуществами перед митохондриями вследствие резкого укорочения пути АТФ к активным центрам миофибрилл. Необходимость гликолиза в энергетике мышц была отмечена Кори [3], который высказал предположение, что конфигурация сократительных белков определяет активность гликолитического комплекса. Высокая степень корреляции активности гликолитических ферментов с Mg^{2+} -АТФ-азой актомиозина в постнатальном периоде развития, обнаруженная в данной работе, в полной мере соответствует представлению о наличии комплекса, который необходим для сопряжения процессов произвольного сокращения и энергообеспечения в скелетной мышце.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ларионов Н. П., Кротенко Н. М. — «Вопр. мед. химии», 1976, № 5, с. 603. — 2. Meyer F., Heilmeyer L. M., Haschke R. et al. — «J. biol. Chem.», 1970, v. 245, p. 6642. — 3. Karpatkin S., Helmreich E., Cori C. F. — Ibid., 1964, v. 239, p. 3139. — 4. Arnold H., Pette D. — «Europ. J. Biochem.», 1968, v. 6, p. 163. — 5. Pette D., Brandau H. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1962, v. 9, p. 367. — 6. Baldwin K. M., Winder W. W., Hollosz J. O. — «Am. J. Physiol.», 1975, v. 229, p. 422. — 7. Zak R. J. et al. — In: Research in Muscle Development and the Muscle Spindle. New York, 1971, p. 163—175. — 8. Rathbun W., Betlach M. — «Analyt. Biochem.», 1969, v. 28, p. 436. — 9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 10. Ларионов Н. П. — «Бюлл. exper. биол.», 1976, № 9, с. 1054. — 11. Atkinson D. E., Hathaway J. A., Smith E. C. — «J. biol. Chem.», 1965, v. 240, p. 2682. — 12. Лакин Г. Ф. Биометрия. М., 1973, с. 172—175. — 13. Pette D., Luh W., Bücher Th. — «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 1962, v. 7, p. 419. — 14. Atkinson D. E. — In: The Metabolic Roles of Citrate. New York, 1969, p. 23. — 15. Lundsgaard E. — «Biochem. Z.», 1930, Bd 217, S. 162. — 16. Любимова Н. М., Энгельгардт В. А. — «Биохимия», 1939, т. 4, № 6, с. 716.

Поступила 30/III 1977 г.

DYNAMICS OF ACTOMYOSIN ATPASE ACTIVITY AS COMPARED WITH GLYCOLYTIC ENZYMES ACTIVITY IN SKELETAL MUSCLES AT EARLY POSTNATAL PERIOD OF DEVELOPMENT

N. P. Larionov, N. M. Krotenko

Medical School, Krasnoyarsk

ATPase activity of actomyosin and activity of glycogenolytic enzymes were distinctly increased during postnatal period of development. Direct correlation was observed between the actomyosin ATPase and phosphofructokinase, phosphohexoisomerase, enolase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase and «bound» fraction of aldolase. Kinetic patterns of phosphofructokinase (K_m and Hill's coefficient) were not altered at the postnatal period. Formation of complexes between the contractile proteins and glycolytic enzymes appears to be important in development of contractile function.

Г. Г. Иванов

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ

Лаборатория хирургической гастроэнтерологии ЦНИЛ Свердловского медицинского института на базе Курганской областной больницы Курган

Активность щелочной фосфатазы в слизистой оболочке желудка при язве двенадцатиперстной кишки наиболее высока в области привратника по малой кривизне и постоянно понижается по мере удаления от него. При локализации язвы в желудке активность фермента высока по всей малой кривизне и становится максимальной в зоне язвы. По ингибирующему действию L-фенилаланина и степени инактивации при нагревании в течение 15 мин при 56°C щелочная фосфатаза слизистой оболочки желудка приближается к свойствам кишечной фосфатазы. В отличие от последней щелочная фосфатаза желудка устойчива к нагреванию при 65°C в течение 5 мин, сохраняя при этом 50% исходной активности.

Ранее было показано, что язвенная болезнь желудка характеризуется увеличением активности щелочной фосфатазы в зоне язвы и в прилежащих к язве участках слизистой оболочки по малой кривизне [1]. Известно, что неизменной слизистой оболочке желудка человека при гистохимическом исследовании щелочная фосфатаза не выявляется. В случаях, когда ее активность проявляется, это, как правило, связано с энтеролизацией [2—4].

Учитывая, что щелочная фосфатаза часто определяется в желудочном содержимом больных язвенной болезнью и отсутствует у здоровых [5], мы сочли важным изучить некоторые свойства фермента одновременно в слизистой оболочке желудка, а также в желудочном и дуоденальном содержимом для выяснения источника ее происхождения. Это важно потому, что в определенных случаях (при недостаточности пилорического клапана) фермент может быть заброшен в желудок в составе дуоденального содержимого [6]. По данным ряда авторов [7, 8], щелочная фосфатаза печени, костной ткани, кишечника и плаценты отличается разной чувствительностью к L-фенилаланину, мочевины и температурному воздействию, что позволяет дифференцировать тот или иной изоэнзим в сыворотке крови. В связи с этим представляло интерес сравнить действие этих факторов на щелочную фосфатазу слизистой оболочки желудка и тонкой кишки.

Методика

Были изучены электрофоретические свойства, влияние срока хранения гомогената, температуры, L-фенилаланина и мочевины на активность щелочной фосфатазы слизистой оболочки желудка человека, желудочного и дуоденального содержимого при язвенной болезни. Кроме того, изучена активность фермента по малой и большой кривизне желудка в различных участках слизистой оболочки в зависимости от удаленности от привратника. Фермент выделяли из слизистой оболочки гастроэктомированных препаратов желудка в 0,25 М сахарозе с последующей экстракцией бутанолом [9], а также в глициновом буфере без применения бутанола. Все операции по выделению фосфатазы проводили на холоду, активность определяли с использованием в качестве субстрата паранитрофенилфосфата натрия [10] и фенолфталейнфосфата натрия [11]. Активность фермента выражали в микромолях паранитрофенола на 1 мг белка за 1 мин инкубации при 37°C в слизистой оболочке желудка или в микромолях паранитрофенола и соответственно фенолфталейна на 100 мл желудочного и дуоденального содержимого. Влияние различных условий воздействия на активность фермента выражали в процентах инактивации.

Исследовано 34 резцированных желудка, из них в 16 определена желудочная локализация язвы. Электрофорез проводили в буферной системе при pH 8, 9 и 7% концентрации геля в аппарате фирмы «Reanal», модель 69 ВНР с соответствующим набором реактивов. В качестве субстрата для проявления активности использования β -глицерофосфат натрия в три-буфере с последующей окраской 0,5% раствором нитрата серебра [12].

Для изучения термостабильности фермента часть гомогената нагревали при 56°C в течение 15, 30 и 60 мин; другую порцию гомогената начинали нагревать при 60°C, постепенно (в течение 15 мин) повышая температуру до 65°C, и выдерживали при данной температуре

5 мин, после чего пробирки быстро охлажда-
ли до комнатной температуры. Те же процеду-
ры проводили с желудочным и дуоденальным
содержимым.

Л-фенилаланин вносили в пробу в ко-
нечной концентрации 0,005 М, добавляли
субстрат и инкубировали при 37°C в течение
30 мин, после чего определяли активность
фермента. Мочевину вносили в пробу в кон-
центрации 3 М и выдерживали при комнат-
ной температуре в течение 18 мин до начала
определения.

Результаты и обсуждение

Исследование активности щелоч-
ной фосфатазы по малой кривизне же-
лудка в зависимости от удаленности
от привратника выявило определен-
ную закономерность, связанную с ло-
кализацией язвы в желудке или две-
надцатиперстной кишке. Так, при яз-
ве двенадцатиперстной кишки в неиз-
мененной слизистой оболочке наи-
большая активность щелочной фосфа-
тазы выявляется в участке, непосред-
ственно примыкающем к приврат-
нику, и прогрессирующе понижается
по мере удаления от него. Если в
первом участке активность фосфатазы
принять за 100 %, то на расстоянии
3 — 5 см по малой кривизне она со-
ставляет 53 %, а на расстоянии 5 —
7 см — 36 % и в участке, удаленном
больше чем на 7 см, — лишь 32,5 %.
Активность щелочной фосфатазы по
большой кривизне желудка не зави-
сит от удаленности от привратника и
на первых двух участках значитель-
но ниже, чем по малой кривизне.

Иные соотношения выявляются
при локализации язвы в желудке.
В этом случае понижения активности
щелочной фосфатазы по малой кри-
визне по мере удаления от приврат-
ника не наблюдается, а в отдельных
наблюдениях она даже увеличивается
по мере приближения к язвенно-
му дефекту. Сравнение средних дан-
ных показывает (табл. 1), что актив-
ность щелочной фосфатазы на рас-
стоянии до 7 см по малой кривизне
практически одинакова, а наиболее
высокая активность отмечается в зоне
язвы. Следует отметить, что в иссле-
дованных нами случаях язва желуд-
ка никогда не располагалась на рас-
стоянии, больше чем 5—7 см по ма-
лой кривизне, чем, вероятно, и объяс-

Таблица 1
Активность щелочной фосфатазы в различных участках слизистой оболочки желудка по малой и большой кривизне (в мкмоль паранитрофенола/мг
белка/мин)

Локализация язвы	Кривизна	Расстояние от привратника, см					область язвы
		0 — 2, 5	3 — 5	5 — 7	> 7		
Желудок	Малая	1,07±0,067 (10)	1,06±0,073 (10)	0,93±0,14 (5)	0,38±0,2 (2)	1,60±0,10 (16)	
	Большая Р по отношению малой кривизны к области язвы	1,01±0,083 (9) ≤0,001	0,86±0,064 (5) ≤0,001	0,79±0,12 (5) ≤0,01	— ≤0,01	—	
Двенадцатиперстная кишка	Малая	1,69±0,09 (18)	0,89±0,087 (17)	0,61±0,09 (15)	0,55±0,075 (5)	—	
	Большая Р по отношению к первому участку по малой кривизне	0,67±0,11 (10) —	0,68±0,075 (11) ≤0,001	0,63±0,087 (10) ≤0,001	0,60±0,18 (4) ≤0,001	—	

Таблица 2

Инактивация щелочной фосфатазы (в %) под влиянием различных факторов

Условия опыта		Источник фермента			
субстрат, условия выделения фермента	воздействие	неизмененная слизистая оболочка желудка	область язвы	желудочное содержимое	дуоденальное содержимое
Паранитрсфенилфосфат натрия, бутаноловая экстракция	Нагревание: 56°, 15 мин 56°, 30 мин 56°, 60 мин 60—65°, 5 мин с бутанолом 60—65°, 5 мин без бутанола в глицериновом буфере L-Фенилаланин 3 М мочевины, 18 мин	80±7,79 76,3±7,32 85,9±5,95 100	73,5±15,0 79,0±9,3 88,0±7,5 100	51,7±7,2 58,4±4,1 52,3±6,3 59,8±6,94	93,0±6,8 96,0±9,4 100 100
Фенолфталенилфосфат натрия в глицериновом буфере рН 9,9	56°, 15 мин 60—65°, 5 мин L-Фенилаланин 3 М мочевины, 18 мин	36,0±3,3 29,4±3,6 30,0±2,8 84,0±8,85	37,5±11,1 29,0±4,7 61,0±8,2 —	— — — —	— — — —

няется низкая активность фосфатазы в участке, удаленном более чем на 7 см от привратника.

Таким образом, распределение активности щелочной фосфатазы в слизистой оболочке желудка по малой кривизне зависит от локализации язвы в желудке или двенадцатиперстной кишке. Если сравнить полученные нами данные с щелочными зонами, выявленными Сарреч [13] при язвенной болезни, можно проследить определенную связь активности щелочной фосфатазы с этими зонами. Так, если в норме щелочная зона в желудке не распространяется выше 3—4 см от привратника, то при язве двенадцатиперстной кишки она простирается до 5—7 см. При локализации язвы в желудке распространение щелочных зон зависит от высоты локализации язвы по малой кривизне; при этом верхняя граница зоны, как правило, располагается на 2—3 см выше язвы. Такая же картина выявляется и при изучении активности щелочной фосфатазы при язве желудка. При язве двенадцатиперстной кишки самая низкая активность фермента определяется на расстоянии 5—7 см от привратника, т. е. примерно там, где заканчивается щелочная зона.

Изучение активности щелочной фосфатазы в зависимости от срока хранения гомогената при 4°C показало, что через 24 ч она составляет $101 \pm 8,0$ %, через 48 ч — $90,4 \pm 7,2$ %, через 72 ч — $75,0 \pm 13,4$ % и через 144 ч — $61,0 \pm 10,0$ % первоначальной активности. Эти данные показывают относительную устойчивость фермента при дли-

тельном хранении гомогената и полное сохранение активности в течение 24 ч.

Воздействие различных факторов на активность щелочной фосфатазы варьирует в зависимости от метода выделения фермента и применяемого субстрата. Так, фосфатаза слизистой оболочки желудка, выделенная на сахарозе с применением бутанола, полностью ингибируется при 60—65°C, в то время как фермент, полученный с применением глицинового буфера, в этих условиях теряет лишь половину своей активности. При использовании в качестве субстрата фенолфталеинфосфата натрия фермент оказывается в 2 раза менее чувствительным к действию температуры (табл. 2). Нагревание при 56°C в течение 15 мин инактивирует щелочную фосфатазу слизистой оболочки на 73—80 %, что совпадает с данными других авторов [7, 8] для кишечной фосфатазы. Удлинение времени нагревания, как это видно из табл. 2, не вызывает дальнейшего угнетения активности.

Ингибирующее влияние L-фенилаланина на активность щелочной фосфатазы слизистой оболочки желудка несколько ниже, чем на кишечный фермент, тем не менее щелочную фосфатазу слизистой оболочки желудка можно отнести к L-фенилаланинчувствительным ферментам. По чувствительности к ингибирующему действию мочевины щелочная фосфатаза слизистой оболочки желудка сходна с печеночной фосфатазой.

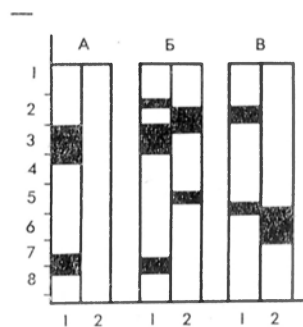
Нами не выявлено различий во влиянии изученных факторов на активность фермента из неизменной слизистой оболочки и оболочки из зоны язвенного дефекта.

Анализируя данные табл. 2, можно заключить, что щелочная фосфатаза слизистой оболочки желудка человека при язвенной болезни по влиянию на нее нагревания при 56°C в течение 15 мин и действию L-фенилаланина близка к кишечной фосфатазе, но в отличие от последней обладает свойством сохранять определенную активность после прогревания при 60—65°C. Таким же свойством обладает и щелочная фосфатаза желудочного содержимого больных язвенной болезнью, тогда как фосфатаза дуоденального содержимого при данной температуре инактивируется полностью. Такое различие в активности щелочной фосфатазы желудочного и дуоденального содержимого позволяет применить данный тест для практических целей выявления процента заброса дуоденального содержимого в желудок.

Впервые щелочная фосфатаза, устойчивая к тепловой денатурации при 65°C в течение 5 мин, была обнаружена в плаценте, а затем в 1968 г. в сыворотке крови больного раком легкого [14] и по фамилии больного получила название Regan-изоэнзима.

Определение как общей, так и термостабильной щелочной фосфатазы в желудочном содержимом больных язвенной болезнью показало, что активность термостабильной фракции (нагревание при 60—65°C) всегда ниже общей активности. Наиболее часто и в более высоких концентрациях термостабильная фракция фермента обнаруживается в желудочном содержимом больных с пострезекционным желчным рефлюкс-гастритом, затем — при язвенной болезни желудка и реже — у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки.

Изучение электрофоретических свойств щелочной фосфатазы слизистой оболочки и желудочного содержимого больных язвенной болезнью показало, что как общая, так и термостабильная фракция фермента разде-



+

Электрофорез щелочной фосфатазы в 7% полиакриламидном геле pH 8,9.

A — щелочная фосфатаза слизистой оболочки желудка; гомогенат на 0,25 М сахарозе, бутаноловая экстракция; B — то же на глициновом буфере без бутанола; B — нативное желудочное содержимое. 1 — общая активность; 2 — после прогревания при 60—65°C в течение 5 мин.

ляется на две четкие полосы, одна из которых малоподвижна и располагается близко к катоду, т. е. недалеко от линии старта, другая, более подвижная, расположена ближе к аноду (см. рисунок). Медленно движущаяся фракция имеет более интенсивную окраску и широкую полосу, чем быстродвижущаяся. Обнаруженная у одного из больных язвой желудка в сыворотке крови термостабильная фракция (60—65°C) при электрофорезе соответствует быстродвижущейся фракции щелочной фосфатазы слизистой оболочки желудка.

Выявление фосфатазной активности в слизистой оболочке желудка и особенно ее термостабильной фракции, составляющей почти 50 % общей, по нашему мнению, связано с определенными структурными изменениями слизистой оболочки желудка при язвенной болезни, а именно с ее энтерололизацией. Определение отдельных фракций фермента в желудочном содержимом отражает характер изменений в слизистой оболочке желудка и позволяет высказать предположение о наличии структурных изменений слизистой оболочки у данного больного, а высокая активность термостабильной фракции является показанием для фиброгастроскопии с биопсией.

Возможно, что и неизменная слизистая оболочка здоровых в какой-то мере обладает фосфатазной активностью, о чем свидетельствует выявление ферментативной активности на значительном удалении от привратника по большой кривизне желудка при язве двенадцатиперстной кишки. С большой осторожностью упоминают об этом и другие исследователи [15]. Если это предположение правильно, то физиологическая и биохимическая роль щелочной фосфатазы в слизистой оболочке желудка остается неясной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов Г. Г. — «Вопр. мед. химии», 1976, № 3, с. 339—342.
2. Лукина Т. А. — В кн.: Ферменты в лабораторной диагностике. Т. 4. М., 1973, с. 24—25.
3. Джумаханов Т. Р., Мироджов Г. К., Ладная М. М. — В кн.: Эндоскопия в современной гастроэнтерологии. Душанбе, 1973, с. 36—38.
4. Planteydt H., Willighagen R. — «J. Path.», 1960, v. 80, p. 317—323.
5. Иванов Г. Г., Хомко В. А. — «Лаб. дело», 1976, № 6, с. 325—328.
6. Витебский Я. Д. Хронические нарушения дуоденальной проходимости и язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки. Челябинск, 1976.
7. Stolbach L. — «Ann. N. J. Acad. Sci.», 1969, v. 166, p. 760—773.
8. Kaplan M. — «Gastroenterology», 1972, v. 62, p. 452—468.
9. Smith J., Lightstone P., Perry Y. — «Clin. chim. Acta», 1968, v. 19, p. 499—505.
10. Bessey O., Lowry O., Brock M. — «J. Biol. Chem.», 1946, v. 164, p. 321—325.
11. Свицерская Т. А., Гончарова В. А. — «Лаб. дело», 1969, № 1, с. 57.
12. Stevenson D. — «Clin. chim. Acta», 1961, v. 6, p. 142—143.
13. Capper W., Butler M., Buckler K. et al. — «Ann. Surg.», 1966, v. 163, p. 281—290.
14. Fishman W. — «Nature», 1968, v. 219, p. 697—699.
15. Mireilly E., Fihcera G., Titobello A. — «Acta med. jugosl.», 1970, v. 24, p. 151—158.

Поступила 4/IV 1977 г.

DISTRIBUTION AND SOME PROPERTIES OF ALKALINE PHOSPHATASE IN HUMAN GASTRIC MUCOSA UNDER ULCEROUS IMPAIRMENT

G. G. Ivanov

Laboratory of Surgical Gastroenterology, Central Research Laboratory, Medical School, Sverdlovsk, Regional Hospital, Kurgan

In duodenal ulcer alkaline phosphatase activity was the highest in mucosa of pyloric region of curvatura ventriculi minor and it decreased distinctly in the tissues removed from pylorus. In cases of gastric ulcer, the enzymatic activity was high throughout the curvatura ventriculi minor reaching the maximal value at the ulcerous zone. Alkaline phosphatase from gastric mucosa resembled the enzyme from intestine in its inhibition patterns with L-phenylalanine and in inactivation properties at 56° within 15 min; but, as distinct from the latter, the enzyme was more stable at 65° within 5 min, maintaining 50% of the initial activity.

А. В. Сергеев, С. Н. Быковская, М. О. Раушенбах

БИОСИНТЕЗ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА В ЛИМФОЦИТАХ, СТИМУЛИРОВАННЫХ АЛЛОАНТИГЕНАМИ IN VITRO

Онкологический научный центр АМН СССР, Москва

Изучено влияние различных степеней В₆-авитаминоза на пролиферацию, цитолитическую активность и скорость биосинтеза пиридоксаль-5'-фосфата (ПФ) в лимфоцитах мышей BALB/c, стимулированных in vitro аллогенными облученными клетками мышей СЗН. У животных, содержащихся на В₆-авитаминозной диете в течение 7—22 дней, пролиферативная и цитолитическая активность не была нарушена, однако активность пиридоксалькиназы в стимулированных лимфоцитах в ответ на введение в культуральную среду пиридоксала повышалась в 2^{1/2}—3 раза. Содержание животных в течение 45 дней на диете без пиридоксина приводит к значительному снижению цитолитической активности стимулированных лимфоцитов; индукция пиридоксалькиназы в стимулированных лимфоцитах при этом отсутствует. ПФ в отличие от пиридоксала при добавлении его в культурную среду в концентрации 2,5·10⁻⁴ М частично восстанавливает нарушенные В₆-авитаминозом функции Т-лимфоцитов.

Пиридоксаль-5'-фосфат (ПФ) является одной из основных коферментных форм пиридоксина и в составе пиридоксальзависимых ферментов участвует в многочисленных биосинтетических процессах клетки [1]. Образование ПФ в тканях млекопитающих контролируется пиридоксалькиназой — ПК (КФ 2.7.1.35). Оптимальный уровень содержания пиридоксина и его коферментных форм имеет решающее значение для нормального функционирования лимфоидной ткани. При недостатке витамина В₆ в организме животных нарушается как гуморальный, так и клеточный иммунитет [2]. Экспериментальный В₆-авитаминоз приводит к снижению образования антител в сыворотке крови крыс в ответ на первичное и вторичное введение антигена [3] и вызывает уменьшение числа антителообразующих клеток в селезенке [4]. У В₆-дефицитных животных отмечается ослабление реакции гиперчувствительности замедленного типа в ответ на введение дифтерийного токсина [5] и резко замедляется отторжение аллотрансплантата [6]. Было показано снижение цитотоксической функции Т-лимфоцитов, полученных из грудного протока крыс, содержащихся на В₆-авитаминозной диете [7].

Противоопухолевый и трансплантационный иммунитет связан с функцией Т-лимфоцитов. Однако механизм цитолитической активности лимфоцитов до настоящего времени не выяснен. В последние годы была предложена модель первичного иммунного ответа Т-лимфоцитов в виде смешанной культуры клеток 2 доноров [8]. Реагирующие лимфоциты при контакте с облученными аллогенными лимфоцитами пролиферируют и образуют клон иммунокомпетентных Т-лимфоцитов. Стимулированные таким образом лимфоциты обладают высокой цитолитической активностью против соответствующих клеток-мишеней. Смешанная культура лимфоцитов представляет собой удобный объект для изучения роли биосинтеза ПФ в пролиферативной и цитотоксической функции Т-лимфоцитов.

Методика

Экспериментальные животные. Опыты проводили на мышках-самках BALB/c (H—2^a) и СЗН (H—2^k), полученных из питомника «Столбовая» АМН СССР, массой 23—25 г. При исследовании влияния недостатка витамина В₆ на функцию лимфоцитов мышей BALB/c животных переводили на искусственный рацион, лишенный пиридоксина [9]. Животные контрольной группы ежедневно получали с искусственным кормом пиридоксин из расчета 20 мкг витамина на мышку. Воду мышам давали ad libidum. С целью ускорения развития В₆-авитаминоза мышам опытной группы вводили интубационно 1 раз в сутки изоникотинилгидразид из расчета 80 мкг на мышку в течение первых 3 дней опыта.

Культура лимфоцитов. Селезенки мышей BALB/c и СЗН извлекали в стерильных условиях и осторожно растирали в стеклянном гомогенизаторе с 20 мл культуральной среды (см. ниже). Суспензию фильтровали через марлю и затем подсчитывали число живых лим-

фоцитов, используя окраску эозин-трипановый синий. Клетки мышей СЗН облучали дозой 1000 Р. Лимфоциты мышей BALB/c и СЗН (облученные) смешивали в соотношении 2 : 1 и разливали во флаконы (фирма «Sani Glass»). В 10 мл культуральной среды содержалось $30 \cdot 10^6$ клеток. Через культуральную среду продували CO_2 и флаконы помещали в термостат при 37°C . Контролем служили монокультуры лимфоцитов мышей BALB/c или облученные лимфоциты мышей СЗН. Культуральная среда содержала 100 мл среды RPMI 1629, 20% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, $2 \cdot 10^{-3}$ М/глутамин, $5 \cdot 10^{-3}$ М N-2-оксизетилиперазин-N'-2-этансульфонилоты, $3 \cdot 10^{-6}$ М 2-меркаптоэтанол, пенициллин и стрептомицин по 100 ЕД на 1 мл среды.

Определение цитолитической активности лимфоцитов. Для определения цитолитической активности лимфоцитов из смешанной культуры в качестве клеток-мишеней использовали монослойную культуру опухолевых

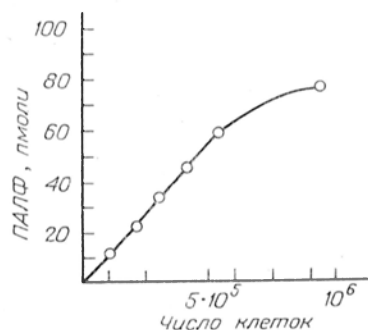


Рис. 1. Образование ПФ в ПК-й реакции в зависимости от количества клеток.

Время инкубации фермента с субстратом 60 мин.

разцов проводили на гамма-счетчике фирмы «Nuclear Chicago» (США). Каждое определение проводили в 5 параллельных пробах. Процент специфического цитолиза рассчитывали по формуле:

$$\text{Освобождение } ^{51}\text{Cr в опыте} = \frac{\text{спонтанное освобождение } ^{51}\text{Cr}}{\text{Полное освобождение } ^{51}\text{Cr} - \text{спонтанное освобождение } ^{51}\text{Cr}} \times 100,$$

где полное освобождение ^{51}Cr было определено после добавления к монослою L-клеток 1% раствора додецилсульфата.

Определение пролиферативной активности лимфоцитов. О скорости пролиферации лимфоцитов судили по количеству ^3H -тимидина, включившегося в ДНК клеток. С этой целью $5 \cdot 10^4$ — $2 \cdot 10^5$ клеток из культуральных флаконов инкубировали в 1 мл среды RPMI 1629, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки, с 1 мкКи ^3H -тимидина (удельная радиоактивность 10 мкКи/мл) в течение 6 ч при 37°C . Затем клетки дважды отмывали холодным 0,9% раствором NaCl и оставляли на ночь в 10% растворе трихлоруксусной кислоты. Осадок переносили на фильтр и промывали 5 мл 10% ТХУ. Фильтры помещали во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости (4,0 г ППО и 0,2 г ПОПОП в 1 л толуола). Радиометрию образцов осуществляли на бета-счетчике «Magk-II». Каждое определение проводили в 2—3 параллельных пробах. Отношение числа импульсов за 1 мин в опыте к числу импульсов за 1 мин в контроле условно принимали за индекс пролиферации. В предварительных опытах было установлено, что в данных условиях инкубации скорость включения ^3H -тимидина в ДНК лимфоцитов прямо пропорциональна количеству клеток в пределах $5 \cdot 10^4$ — $2 \cdot 10^5$ и времени инкубации в пределах 3—8 ч.

Определение активности ПК в лимфоцитах. Для определения активности ПК из культуральных флаконов отбирали по 1 мл среды ($5 \cdot 10^5$ — $5 \cdot 10^6$ клеток), доводили объем до 5 мл 0,9% раствором NaCl и центрифугировали при 1500 g. После повторного отмыwania NaCl к осадку лимфоцитов добавляли 1 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера pH 5,8 и пробы гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. Активность фермента определяли по ранее описанному методу [11]. В предварительных опытах было установлено, что скорость образования ПФ в ПК-й реакции прямо пропорциональна количеству клеток в пределах $2 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^6$ (рис. 1) и времени инкубации в пределах 30—90 мин.

Определение ПФ в тканях. Определение ПФ в ткани печени и селезенки проводили с помощью апофермента триптофаназы из *E. coli* $1/7$ tA по ранее описанному методу [12].

Результаты и обсуждение

Содержание мышей BALB/c на искусственной диете, лишенной пиридоксина, в течение 7—45 дней привело к постепенному снижению массы тела животных, веса печени и селезенки (см. таблицу). Количество ПФ

в селезенке мышей опытной группы снизилось через 7, 22 и 45 дней опыта соответственно на 17, 32 и 55 % контроля. Часть животных к 6-й неделе опыта погибли от клонико-тонических судорог, являющихся характерным признаком глубокого дефицита пиридоксина в организме. Активность ПК в ткани печени и селезенки В₆-авитаминозных мышей практически не изменилась (см. таблицу).

Лимфоциты, полученные из селезенки животных, содержащихся на искусственной диете без пиридоксина в течение 7—21 дня, нормально реагировали на аллоантиген в смешанной культуре. Скорость пролиферации стимулированных лимфоцитов опытной группы не отличалась от скорости пролиферации лимфоцитов контрольной группы. Цитолитическая активность лимфоцитов также не была изменена.

Активность ПК в лимфоцитах, полученных от контрольных животных и культивируемых *in vitro*, равнялась $12\text{—}13 \text{ E}/10^6$ клеток и не изменялась в процессе пролиферации лимфоцитов в ответ на аллоантигенное стимулирование (рис. 2). Активность фермента в лимфоцитах, взятых от животных, содержащихся на В₆-авитаминозной диете в течение 7 дней, при введении в среду пиридоксаля в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ возрастала на 3-й день инкубации *in vitro* в среднем в $2^{1/2}$ — $3^{1/2}$ раза (см. рис. 2). Концентрация пиридоксаля вводимого в инкубационную среду была установлена в предварительных опытах. Через 3 нед эксперимента индукция фермента в ответ на аллоантигенное стимулирование и добавление в среду пиридоксаля не обнаруживалась. Величина K_m , определенная методом Лайнуивера — Берка, для препаратов ПК из лимфоцитов с нормальной и повышенной активностью была одинаковой и составляла $2,5 \cdot 10^{-5}$ — $5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Значительные изменения пролиферативной и цитолитической активности лимфоцитов были обнаружены у животных, содержащихся на диете без пиридоксина в течение 45 дней. Лимфоциты этих животных реагировали на аллоантиген, однако

Изменение веса печени и селезенки и содержание ПФ в органах мышей, содержащихся на диете без пиридоксина ($M \pm m$)

Группы мышей	День от начала опыта	Вес печени, мг	Вес селезенки, мг	Содержание ПФ, мкг на 1 г сырого веса		Активность ПК, Е/мг белка		Масса мышей, г
				в печени	в селезенке	в печени	в селезенке	
Контроль Диета (без пиридоксина) Контроль Диета (без пиридоксина) Контроль Диета (без пиридоксина) Контроль Диета (без пиридоксина) Контроль Диета (без пиридоксина)	7-й	1620±130	165±31	7,31±1,22	0,92±0,13	0,51±0,06	0,15±0,04	25±2,5
	7-й	1570±110	152±37	6,2±0,85	0,76±0,09	0,60±0,072	0,21±0,06	23±4,1
	14-й	1550±145	155±16	7,4±1,08	0,91±0,11	0,46±0,06	0,14±0,03	23±3,8
	14-й	1480±115	110±23	5,8±0,65	0,67±0,07	0,49±0,08	0,17±0,04	19±2,1
	22-й	1570±131	150±22	7,68±0,94	0,93±0,065	0,41±0,055	0,13±0,05	21±1,8
	22-й	1430±120	98±19	5,16±0,78	0,64±0,05	0,39±0,07	0,16±0,03	17±1,4
	33-й	1510±116	141±16	6,8±1,1	0,89±0,09	0,40±0,06	0,14±0,06	20,5±1,9
	33-й	1270±125	73±17	4,5±0,72	0,52±0,076	0,35±0,04	0,13±0,02	16,3±1,8
	45-й	1420±107	138±21	6,65±1,3	0,85±0,08	0,38±0,07	0,11±0,04	18,5±1,6
	45-й	1113±89	52±16	3,85±0,96	0,38±0,055	0,31±0,05	0,09±0,02	14,3±2,5

Примечание. В каждой группе было от 8 до 10 животных; приведены значения $\bar{x} \pm tS$ при $n=8\text{—}10$ и $P=0,05$.

эта реакция была выражена очень слабо. Пик пролиферации лимфоцитов был сдвинут с 4-го к 7-му дню инкубации, и включение метки в ДНК клеток составляло только 50 % контроля (рис. 3). Пик цитолитической активности лимфоцитов был также сдвинут с 4-го к 7-му дню инкубации, и величина специфического лизиса L-клеток не превышала 30—40 % контроля при стандартном соотношении лимфоцитов и клеток-мишеней (рис. 4).

Части животных, содержащихся на B_6 -авитаминозной диете в течение 40 дней, внутрибрюшинно инъецировали 50 мкг пиридок-

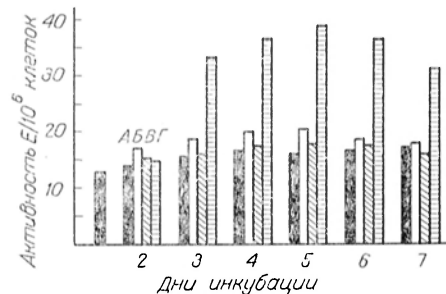


Рис. 2. Активность ПК в стимулированных лимфоцитах.

А, В — лимфоциты получены из селезенок животных, содержащихся на диете с добавлением пиридоксина (контроль); С, Д — лимфоциты получены от животных, содержащихся на B_6 -авитаминозной диете в течение 7 дней; В, Д — в культуральную среду *in vitro* добавлен пиридоксаль в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ М.

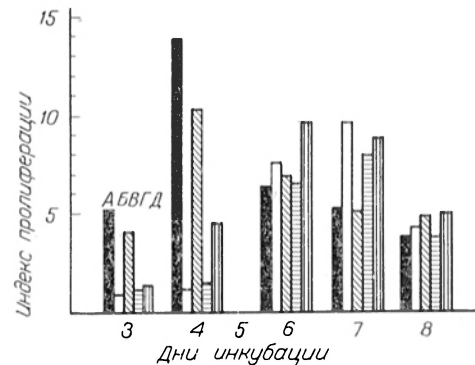


Рис. 3. Влияние недостатка в диете пиридоксина (45 дней авитаминоза) на пролиферацию лимфоцитов, стимулированных *in vitro*.

А — лимфоциты получены от мышей, содержащихся на диете с добавлением пиридоксина; В — Д — лимфоциты получены от мышей, содержащихся на B_6 -авитаминозной диете в течение 45 дней; В — мышам за 5 дней до забоя введено 50 мкг пиридоксали; С, Д — в систему *in vitro* добавлено соответственно пиридоксаль и ПФ в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ М.

сая за 5 дней до забоя. Лимфоциты, полученные от этих животных, пролиферировали в смешанной культуре *in vitro* почти с такой же скоростью и в те же сроки, как и лимфоциты, полученные от контрольных животных (см. рис. 3). Однако цитолитическая активность лимфоцитов была резко снижена во все сроки инкубации (см. рис. 4). Пиридоксаль,

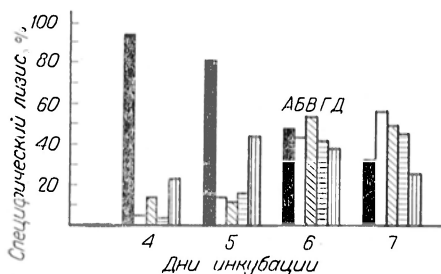


Рис. 4. Влияние недостатка в диете пиридоксина (45 дней авитаминоза) на цитолитическую активность лимфоцитов, стимулированных *in vitro*.

Обозначения те же, что на рис. 3.

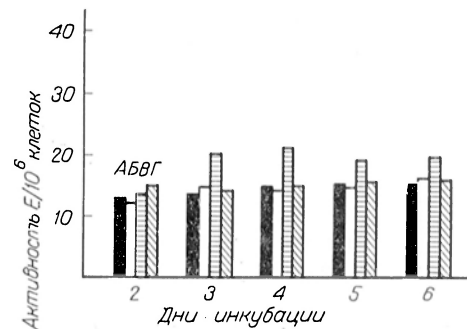


Рис. 5. Активность ПК в стимулированных лимфоцитах.

А — лимфоциты получены из селезенок контрольных животных; В — Д — лимфоциты получены из селезенок животных, содержащихся на B_6 -авитаминозной диете в течение 45 дней; В — животным за 5 дней до забоя введено внутрибрюшинно 50 мкг пиридоксали; С, Д — в систему *in vitro* добавлен пиридоксаль в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ М.

добавленный непосредственно в систему *in vitro* в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, не восстанавливал ни пролиферативной, ни цитолитической активности лимфоцитов (см. рис. 3, 4). В отличие от этого ПФ, введенный в систему *in vitro*, частично восстанавливал как способность лимфоцитов к пролиферации (см. рис. 3), так и их цитолитическую активность (см. рис. 4).

Активность ПК в лимфоцитах, полученных от животных, содержащихся на В₆-авитаминозной диете в течение 45 дней, повышалась на 30—40 % только в случае введения пиридоксала внутривенно (рис 5).

Лимфоидная ткань млекопитающих крайне чувствительна к недостатку пиридоксина. При В₆-авитаминозе у животных и человека быстро развивается лимфопения и наблюдается атрофия ткани тимуса [13]. В наших экспериментах нарушение функции Т-лимфоцитов отмечалось на поздней стадии В₆-авитаминоза, когда количество ПФ в печени и селезенке животных снижалось до критического уровня. При этом изменения носили скорее количественный характер: пики пролиферативной и цитолитической активности лимфоцитов были сдвинуты на более поздние сроки инкубации. В то же время в лимфоцитах уже в самом начале развития В₆-дефицитного состояния были обнаружены изменения в скорости биосинтеза ПФ. Активность ПК в лимфоцитах, полученных от животных, содержащихся на В₆-авитаминозной диете в течение 7 дней и стимулированных *in vitro* аллоантигенами, повышалась в 2^{1/2}—3 раза. Индукция ПК в стимулированных лимфоцитах в ответ на введение в инкубационную среду субстрата (пиридоксала), по-видимому, носит компенсаторный характер. В селезенке В₆-авитаминозных животных и в лимфоцитах, полученных от контрольных животных и стимулированных *in vitro*, изменений в активности фермента обнаружено не было.

Особый интерес представляет факт повышения цитолитической активности лимфоцитов при добавлении в инкубационную среду ПФ. До настоящего времени остается нерешенным вопрос о возможности проникновения фосфорилированных форм пиридоксина через мембраны лимфоцитов. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что ПФ может быть использован для устранения нарушенных В₆-авитаминозом функций Т-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А. Е. — «Enzymes», 1960, v. 2, p. 113. — 2. Axelrod A. E. — «Am. J. clin. Nutr.», 1971, v. 24, p. 265. — 3. Stoerk H. C., Eisen H. N., John H. M. — «J. exp. Med.», 1947, v. 85, p. 365. — 4. Kumar M., Axelrod A. E. — «J. Nutr.», 1968, v. 96, p. 53. — 5. Axelrod A. E., Trakatlilis A. C., Bloch W. R. et al. Ibid., 1963, v. 79, p. 161. — 6. Axelrod A. E., Trakatlilis A. C. — «Vitam. a. Horm.», 1964, v. 22, p. 591. — 7. Robson L C., Schwarz M. R. — «Cell. Immunol.», 1975, v. 16, p. 135. — 8. Cunningham A. J. — Ibid., v. 19, p. 368. — 9. Букин Ю. В., Сергеев А. В. — «Биохимия», 1968, т. 33, с. 1092. — 10. Brunner K. T., Maue J., Serottini J. C. et al. — «J. Immunol.», 1968, v. 14, p. 191. — 11. Букин Ю. В. — «Прикладная биохим.», 1973, № 2, с. 286. — 12. Букин Ю. В., Сергеев А. В. — Там же, 1970, № 4, с. 456. — 13. Rosen F., Mihich E., Nichol C. A. — «Vitam. a. Horm.», 1964, v. 22, p. 609.

Поступила 6/IV 1977 г.

BIOSYNTHESIS OF PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE IN LYMPHOCYTES, STIMULATED BY ALLOANTIGENS IN VITRO

A. V. Sergeev, S. N. Bykovskaya, M. O. Raushenbah

Research Oncologic Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Dynamics of alterations in pyridoxal kinase activity (key enzyme in biosynthesis of pyridoxal-5'-phosphate) was studied in lymphocytes of mice BALB/c, stimulated by irradiated cells from spleen of mice C3H *in vitro*. The cytolytic activity of lymphocytes was estimated by amount of Na₂⁵¹CrO₄ realised from lysed cell-targets into medium. Maintenance of animals on a diet without pyridoxine within 1-3 weeks did not effect on the capacity of lymphocytes to proliferate *in vitro* and on their cytolytic activity. At the same time pyridoxal kinase activity was increased 2.5-3-fold in stimulated lymphocytes in presence of pyridoxal. K_m value was 2.5-5.0 · 10⁻⁵ M of pyridoxal for preparations of pyridoxal kinase from lymphocytes either with normal or with increased enzymatic activity. Lymphocytes of mice, kept on the diet without pyridoxine within 5-6 weeks, were characterized by distinctly decreased proliferative and cytolytic activities. Pyridoxal-5'-phosphate, added to incubation mixture *in vitro*, as distinct from pyridoxal, restored partially the impaired functions of T-lymphocytes.

Э. А. Ширинян, О. М. Авакян

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛЭКТОМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ СИМПАТЭКТОМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Лаборатория адренергических механизмов Института тонкой органической химии им. А. Л. Миджояна АН Армянской ССР, Ереван

Определяли содержание адреналина, норадреналина, дофамина и норметанефрина в пробах целого мозга и гипоталамической области интактных, адреналэктомированных и симпатэктомированных крыс через 15 мин, 24 и 72 ч после геморрагического стресса. Во все сроки исследования в мозге животных 3 групп обнаружено стабильное повышение содержания дофамина. Изменения оборота норадреналина в центральной нервной системе (ЦНС) в ранние постгеморрагические периоды связаны с состоянием симпатико-адреналовой системы на периферии, чего не удалось обнаружить в поздние сроки после стресса.

Многочисленными исследованиями установлено, что при массивной кровопотере изменяется содержание катехоламинов в крови, сердце, селезенке и надпочечниках [1—8]. При этом происходят значительные функциональные, гемодинамические и метаболитические изменения в ЦНС [9], однако влияние геморрагического стресса на содержание моноаминов в мозге изучено недостаточно [1]. Возрастающий интерес к важной роли моноаминов в организации приспособительных реакций организма делает целесообразным исследование не только их содержания в участках мозга, обеспечивающих гомеостаз, но и связи изменений в ЦНС с состоянием симпатико-адреналовой системы на периферии.

В настоящей работе представлены результаты изучения влияния геморрагического стресса на содержание катехоламинов и норметанефрина в целом мозге и гипоталамусе интактных, адреналэктомированных и симпатэктомированных крыс.

Методика

Геморрагический стресс вызывали у интактных (1-я группа), адреналэктомированных (2-я группа) и симпатэктомированных (3-я группа) крыс-самцов весом 250—300 г путем острого кровопускания (3% крови к весу тела в течение 20 мин под легким эфирным наркозом) из препарированной правой бедренной артерии, после чего на сосуд накладывали лигатуру. Через $\frac{1}{4}$, 24 и 72 ч после операции животных обезглавливали и в пробах целого мозга (без гипоталамической области) и в гипоталамической области определяли содержание адреналина, норадреналина, дофамина и норметанефрина триоксинидольным методом [10], используя спектрофотометр фирмы «Hitachi». Контролем для 1-й группы служили ложнооперированные крысы.

Двустороннюю адреналэктомию проводили под легким эфирным наркозом. В послеоперационный период животные вместо воды получали раствор, содержащий 1% NaCl и 5% глюкозы. Опыты на данной серии животных ставились на 3-й день после адреналэктомии. Контролем служили адреналэктомированные животные с имитацией процедуры кровопускания.

Химическую симпатэктомию осуществляли посредством внутрибрюшинного введения 30 мг/кг 6-ОН-дофамина фирмы «Serva», растворенного в физиологическом растворе с 0,1% аскорбиновой кислотой. Животных подвергали кровопусканию через 48 ч. Контролем служили симпатэктомированные крысы с имитацией процедуры кровопускания.

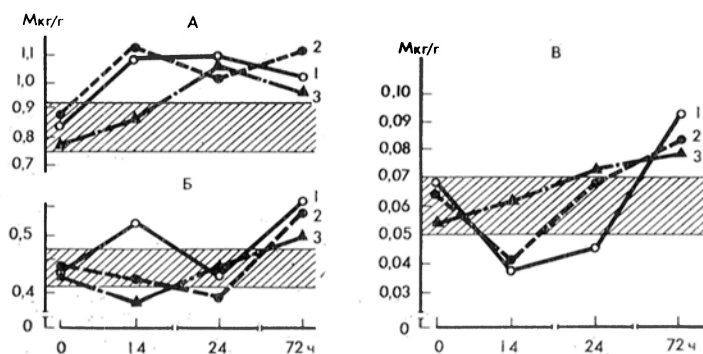
Так как вышеуказанные эксперименты были поставлены в разные времена года, то для более точной интерпретации данных было проведено дополнительное исследование содержания моноаминов одновременно у контрольных животных всех 3 групп.

Результаты были обработаны статистически с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Данные опытов с контрольными животными (см. рисунок, нулевые отметки) свидетельствуют о том, что сама адреналэктомию или введение 6-оксидофамина не приводит к достоверным изменениям содержания дофамина, норадреналина и норметанефрина в целом мозге.

Геморрагический стресс вызывал в целом мозге стабильное увеличение уровня дофамина у животных всех исследуемых групп, хотя у симпатэктомированных крыс в первые 15 мин содержание дофамина не изменялось, а в дальнейшем повышение его уровня было наименьшим. В конце экспериментального периода у животных всех 3 групп концентрации исследуемых веществ в мозге превышали контрольные показатели. При этом в первые сутки после стресса направление изменений содержания норадреналина и норметанефрина у животных 3-й (симпатэктомированной) группы резко отличалась от такового у животных 1-й (интактной) группы: началь-



Влияние геморрагического стресса на содержание дофамина (А), норадреналина (Б) и норметанефрина (В) в мозге интактных (1), адреналэктомированных (2) и симпатэктомированных (3) крыс.

Показатели, находящиеся вне заштрихованных полос, статистически достоверны ($P < 0,05$). Данные о количестве опытов в каждой серии те же, что в таблице.

ному повышению уровня медиатора (на 20 %), сопровождающемуся резким снижением содержания его метилированного метаболита у крыс 1-й группы, соответствовали обратные изменения их содержания у симпатэктомированных животных. Первоначального накопления норадреналина не наблюдалось и у адреналэктомированных животных.

В таблице представлены изменения содержания исследуемых аминов в гипоталамической области. При сопоставлении контрольных данных видно, что при адреналэктомии происходит достоверное уменьшение уровня норадреналина.

Геморрагический стресс приводил у интактных и адреналэктомированных животных к понижению содержания норадреналина в гипоталамической области лишь в отдаленные постгеморрагические периоды. При симпатэктомии уже на 15-й минуте после воздействия отмечалось снижение концентрации норадреналина на 25 %, а к 72 ч исследования уровень медиатора в гипоталамической области превышал контрольный показатель на 60 %. При адреналэктомии изменение содержания адреналина и дофамина (в основном в сторону увеличения в отличие от норадреналина) возникало позже, чем у животных 1-й группы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что сама химическая симпатэктомия не приводит к изменению содержания катехоламинов в ЦНС. Это согласуется с представлением [11] о непроницаемости гемато-энцефалического барьера для 6-ОН-дофамина у взрослых крыс. Снижение уровня норадреналина в гипоталамической области при адреналэктомии, отмеченное также другими исследователями, рассматривается как показатель развития выраженной адреналовой недостаточности [12].

Снижение содержания норадреналина в гипоталамической области во всех исследуемых сериях при геморрагическом стрессе соответствовало изменениям при других стрессовых воздействиях [13—17] и особенно при циркуляторно-гипоксических состояниях [18—20]. Подобное понижение

концентрации медиатора объясняется в литературе превалирующим возрастанием высвобождения по сравнению с процессом синтеза норадреналина [15, 21]. Свидетельством одновременной активации синтеза и метаболизма норадреналина является повышение концентрации его предшественника — дофамина в наших опытах и данные литературы о резком возрастании его метаболита — 4-окси-3-метоксифенилэтиленгликоля в гипоталамической области при шоковых состояниях [22] и ишемии головного мозга [21]. При этом у симпатэктомированных животных постгеморрагическое усиление оборота медиатора наступает раньше, чем у крыс интактной и адреналэктомированной групп.

Влияние геморрагического стресса на содержание адреналина, норадреналина и дофамина (мкг/г сырой ткани) в гипоталамической области интактных, адреналэктомированных и симпатэктомированных крыс

Группа животных, подвергнутых кровопотере	Время, прошедшее после кровопотери	Число опытов	Адреналин	Норадреналин	Дофамин
Интактные	Контроль	27	$0,17 \pm 0,03$	$1,65 \pm 0,08$	$0,81 \pm 0,04$
	15 мин	8	$0,30 \pm 0,04^*$	$1,69 \pm 0,14$	$1,04 \pm 0,15$
	2 ч	7	$0,75 \pm 0,19^*$	$0,63 \pm 0,10^{**}$	$1,11 \pm 0,11^*$
	24 ч	9	$0,24 \pm 0,07$	$0,54 \pm 0,08^{**}$	$1,12 \pm 0,20$
	72 ч	10	$0,27 \pm 0,09$	$1,30 \pm 0,20$	$0,50 \pm 0,07^{**}$
Адреналэктомированные	Контроль	21	$0,26 \pm 0,05$	$1,35 \pm 0,09^{\circ}$	$0,67 \pm 0,1$
	15 мин	6	$0,36 \pm 0,09$	$1,13 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,2$
	24 ч	5	$0,45 \pm 0,06^*$	$0,90 \pm 0,10^*$	$1,22 \pm 0,2^*$
	72 ч	5	$0,51 \pm 0,07^*$	$0,95 \pm 0,09^*$	$1,20 \pm 0,2^*$
Симпатэктомированные	Контроль	14	$0,20 \pm 0,03$	$1,49 \pm 0,10$	
	15 мин	6	$0,23 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,06^*$	
	24 ч	6	$0,19 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,10^*$	
	72 ч	6	$0,21 \pm 0,03$	$2,37 \pm 0,12^{**}$	

Примечание. Звездочками отмечены достоверные различия по сравнению с соответствующими контрольными показателями (1 звездочка — $P < 0,05$; 2 звездочки — $P < 0,01$). Кругочком отмечено достоверное различие ($P < 0,05$) содержания норадреналина в контроле у адреналэктомированной группы по сравнению с соответствующим показателем интактной группы.

Начальное постгеморрагическое повышение содержания норадреналина и резкое снижение концентрации норметанефрина в целом мозге у животных интактной группы явились для нас неожиданностью, так как в литературе имеются сведения, что под действием различных стрессорных факторов в мозге происходит снижение содержания норадреналина [14, 23—26] и возрастание его оборота [22, 25, 27—29]. Подобного повышения уровня норадреналина в других 2 группах не выявлено, по-видимому, в связи с уменьшением активности тирозин-гидроксилазы при адреналэктомии [30] и захвата норадреналина мозговой тканью при химической симпатэктомии [31]. Одинаковая во всех группах направленность сдвигов исследуемых показателей через 72 ч после кровопотери в сторону увеличения может указывать на то, что изменения оборота норадреналина в поздние постгеморрагические сроки не связаны с состоянием симпатико-адреналовой активности на периферии, что имеет место в 1-е сутки после воздействия.

Стабильное увеличение содержания дофамина является одной из характерных особенностей изменений содержания моноаминов мозга при геморрагическом стрессе, так как под действием других стрессоров концентрация и оборот дофамина уменьшаются [6, 26, 29, 32, 33] или не изменяются [24, 25, 27, 32, 34]. То обстоятельство, что содержание дофамина в мозге адреналэктомированных и симпатэктомированных крыс во все сроки после кровопотери существенно не изменяется, свидетельству-

ет о том, что оно мало связано с состоянием симпатико-адреналовой системы на периферии. Увеличение содержания дофамина в мозге при геморрагическом стрессе может иметь для организма положительное значение, так как отмечено, что дофамин играет важную роль в выведении животного из стрессового состояния [35].

ЛИТЕРАТУРА

1. Avakian O. M., Shirinian E. A. — In: Catecholamines and Stress. New York, 1976, p. 475. — 2. Волков А. В., Бунатян А. Ф., Лукичева Т. И. и др. — «Бюлл. exper. биол.», 1973, № 4, с. 20. — 3. Cession-Fossion A., Juchmes J. — «Arch. int. Physiol. biochim.», 1972, v. 80, p. 807. — 4. Hall R., Hodge R. — «Am. J. Physiol.», 1971, v. 221, p. 1305. — 5. Zileli M. S., Geddik O., Adalar N., Caglar S. — «Endocrinology», 1974, v. 95, p. 1474. — 6. Coleman B., Glaviano V. — «Science», 1963, v. 139, p. 54. — 7. Feuerstein G., Gutman Y. — «Brit. Pharmacol.», 1971, v. 43, p. 764. — 8. Gomez-Povina O., Canera J. F. — «J. surg. Res.», 1965, v. 5, p. 341. — 9. Kovach A. G. B., Sandomor P. — «Ann. Rev. Physiol.», 1976, v. 39, p. 571. — 10. Авакян О. М., Ширинян Э. А. — «Вопр. мед. химии», 1976, № 3, с. 377. — 11. Thoenen H., Tranzer J. P. — «Ann. Rev. Pharmacol.», 1973, v. 13, p. 169. — 12. Шаляпина В. Г., Ракицкая В. В. — В кн.: Гипофизарно-адреналовая система и мозг. Л., 1976, с. 67. — 13. Simmonds M., Iversen L. — «Science», 1969, v. 163, p. 473. — 14. Ширинян Э. А. — «Бюлл. exper. биол.», 1971, № 6, с. 46. — 15. Kobayashi R. M., Palkovits M., Kizer J. S. et al. — In: Catecholamines and Stress. New York, 1976, p. 29. — 16. Kvetnansky R., Mitro A., Palkovits M. et al. — Ibid., p. 39. — 17. Stone E. A. — «J. Neurochem.», 1973, v. 21, p. 589. — 18. Debiadjji R., Perovic L., Varagic V. et al. — «Aerospace Med.», 1969, v. 40, p. 495. — 19. Koob G., Annau Z. — «Am. J. Physiol.», 1973, v. 224, p. 1403. — 20. Stoner H. B., Marshall H. W. — «Brit. J. exp. Path.», 1975, v. 56, p. 157. — 21. Stoner H. B., Hunt A. — In: Catecholamines and stress. New York, 1976, p. 113. — 22. Korff J. — Ibid., p. 105. — 23. Stupfel M., Roffill. — «C. R. Soc. Biol.», 1961, v. 155, p. 237. — 24. Bliss E. L., Ailion J., Zwanziger J. — «J. Pharmacol. exp. Ther.», 1968, v. 164, p. 122. — 25. Thierry A., Javoy F., Glowinski J. et al. — «J. Pharmacol. exp. Ther.», 1968, v. 163, p. 163. — 26. Cymerman A., Robinson S., McGullough D. — «Canad. J. Physiol.», 1972, v. 50, p. 321. — 27. Gordon R., Spector S., Sjoerdsma A. et al. — «J. Pharmacol. exp. Ther.», 1966, v. 153, p. 440. — 28. Brown R. M., Snider S. R., Carlsson A. — «J. neural Transmission», 1974, v. 35, p. 293. — 29. Zavyne M. H., Moskowitz M. A., Zervas N. T. et al. — «Neurology (Minneapolis)», 1975, v. 24, p. 483. — 30. Kizer J. S., Palkovits M., Zivin J. et al. — «Endocrinology», 1974, v. 95, p. 799. — 31. Sachs Ch., Jonsson G. — «J. Neurochem.», 1973, v. 21, p. 1517. — 32. Corrodi H., Fuxe K., Lidbrink P. et al. — «Brain Res.», 1971, v. 29, p. 1. — 33. Lidbrink P., Corrodi H., Fuxe K. et al. — Ibid., 1972, v. 45, p. 507. — 34. Gibson S., McGeer E. G., McGeer P. L. — «J. Neurochem.», 1969, v. 16, p. 1491. — 35. Saito H., Morita A., Miyazaki I. et al. — In: Catecholamines and Stress. New York, 1976, p. 95.

Поступила 14/IV 1977 г.

EFFECT OF ADRENALECTOMY AND CHEMICAL SYMPATHECTOMY ON THE CONTENT OF CATECHOLAMINES IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN HEMORRHAGIC STRESS

E. A. Shirinyan, O. M. Avakyan

Laboratory of Adrenergic Mechanisms, Institute of Fine Organic Chemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Content of adrenaline, noradrenaline, dopamine and normetanephrine was estimated by means of trihydroxyindole method in samples of brain and its hypothalamic part from intact, adrenal- and sympathectomized rats within 15 min, 24 and 72 hrs after hemorrhagic stress (3% blood of body weight within 20 min). Stable increase in dopamine content was observed in brain at all the periods studied. Alterations in the noradrenaline turnover in central nervous system were related to the state of peripheral sympathoadrenal system at early posthemorrhagic steps; the phenomenon was not found at the later periods after stress.

М. Г. Величко, Ю. М. Островский, Р. В. Требухина

ТИАМИН И ОБМЕН ПИРУВАТА У КРЫС-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

Отдел регуляции обмена веществ АН Белорусской ССР, Гродно

Исследованы количественное соотношение двух субстратов — пирувата и лактата, а также активность ферментов их метаболизма — пируватдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, аланин-аминотрансферазы и пируваткиназы — в ткани печени на фоне роста опухоли и интенсивной тиаминотерапии. Тиамин в дозе 12,5 мг на 1 кг массы, вводимый ежедневно крысам-опухоленосителям (карциносаркома Уокера 256), оказывает нормализующее действие на активность изучаемых ферментов, количественный состав изоферментов лактатдегидрогеназы и содержание лактата в крови и пирувата в печени.

В процессе роста опухоли в организме происходят глубокие изменения в углеводном обмене, обусловленные, с одной стороны, интенсивным гликолизом в раковых клетках, а с другой — сопутствующими канцерогенезу нарушениями в других смежных звеньях обмена [1]. И то и другое приводит к значительному повышению в крови и тканях количества кетокислот [2] и увеличенному выведению их с мочой [3]. Некоторые авторы склонны объяснять это нарушением окислительных процессов в организме, в частности торможением активности мультиферментного комплекса пируватдегидрогеназы [2, 4]. Таким образом, исследовали витамины — предшественники коферментов, входящих в состав комплекса пируватдегидрогеназы [5], лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и ее изоферментов [6], а также процессы, ответственные за биосинтез соответствующих апоферментных белков или самих ферментов [7]. Определяющими перечисленные нарушения в обмене могут быть и сами субстраты упомянутых реакций [2], и другие кофакторы [8]. Содержание пировиноградной кислоты в крови и тканях животных-опухоленосителей исследовали неоднократно [2, 8, 9], но чаще всего без одновременного сопоставления с другими показателями, характеризующими вероятные пути обмена этой кислоты. Мы определяли соотношения содержания двух субстратов — пирувата и лактата и активность ферментов их метаболизма — пируватдегидрогеназы, ЛДГ, аланин-аминотрансферазы и пируваткиназы — на фоне роста опухоли и интенсивной тиаминотерапии как воздействия, специфическим образом контролирующего активность окислительного декарбоксилирования пирувата [5].

Методика

Опыты проведены на 72 крысах-самках, содержащихся на обычном рационе виария. Карциносаркому Уокера 256 перевивали внутримышечно в область задней правой конечности. Через 24 ч после перевивки опухоли половине животных этой группы начинали ежедневные инъекции тиамин под кожей в дозе 12,5 мг на 1 кг массы. Через 4, 8 и 12 дней после перевивки исследовали ткань печени и кровь, которую собирали в гепаринизированные пробирки на холоду. Белки крови немедленно осаждали 6% хлорной кислотой. Лактат и пируват определяли при помощи ЛДГ [10]. Для оценки содержания субстратов в печени крыс ткань помещали в жидкий азот через 30 с после их декапитации и затем готовили гомогенат на 6% хлорной кислоте в разведении 1 : 5. Растворимую фракцию гомогената печени получали путем измельчения ткани на холоду в 0,02 М трис-буфере pH 7,6 в разведении 1 : 20 и центрифугирования в течение 1 ч при 105 000 g (центрифуга VAC-601). В полученном супернатанте исследовали активность пируваткиназы (КФ 2.7.1.40) [11], прямой и обратной ЛДГ (КФ 1.1.1.27) [11] и аланин-аминотрансферазы (КФ 26.1.1.2) [12]. Для определения активности пируватдегидрогеназы (КФ 1.2.4.1) свежую ткань печени гомогенизировали на холоду в 0,15 М КСl в течение 1 мин в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в разведении 1 : 10. Активность фермента определяли спектрофотометрически [13] и выражали в миллимикромольх восстановленного феррицианида на 1 г ткани за 1 мин инкубации при 25°C. Изоферменты ЛДГ разделяли электрофоретически в 7,5% полиакриламидном геле [14]. Все реактивы фирмы «Reanal». Гель после электрофореза инкубировали в течение 1 ч при 37°C в среде по описанному ранее методу [15]. Количественную оценку активности изоферментов проводили денситометрически и выражали в процентах по отношению к суммарной активности всех фракций фермента. Цифровой материал обрабатывали статистически [16]. Каждая приведенная величина представляет среднюю арифметическую и ошибку средней 7—9 определений.

Результаты и обсуждение

По мере роста опухоли в печени и крови животных-опухоленосителей отмечается достоверное увеличение содержания пирувата (табл. 1). Нами, так же как и другими авторами [2, 17], установлено, что активность пируватдегидрогеназы и аланин-аминотрансферазы в печени ингибируется на 8—12-е сутки роста опухоли (табл. 2). Таким образом, из полученных результатов следует, что по мере роста опухоли в печени отмечается накопление пирувата с одновременным угнетением активности указанных выше ферментов и обратной ЛДГ (табл. 3). Все три фермента являются витаминизависимыми, а обмен витаминов в организме крыс-опухоленосителей, как это показано рядом авторов [2, 3, 18], существенно нарушается. Нами при исследовании обмена тиаминна установлено, что у животных с опухолями в процессе роста карциносаркомы Уокера 256 концентрация тиа-

Таблица 1
Содержание пирувата и лактата (в мкмоль/г ткани) в печени и крови крыс-опухоленосителей (опыт 1) и крыс после введения им тиаминна в дозе 12,5 мг/кг (опыт 2) ($M \pm m$)

Ткань	День исследования	Содержание пирувата			Содержание лактата		
		контроль	опыт 1	опыт 2	контроль	опыт 1	опыт 2
Печень	4-й р	$0,104 \pm 0,009$	$0,180 \pm 0,02$ $<0,001$	$0,082 \pm 0,01$	$3,92 \pm 0,3$	$3,13 \pm 0,3$ $<0,05$	$5,0 \pm 0,37$ $<0,05$
	8-й р	$0,104 \pm 0,009$	$0,309 \pm 0,03$ $<0,001$	$0,089 \pm 0,02$	$3,92 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,3$ $<0,05$	$5,25 \pm 0,37$ $<0,01$
	12-й р	$0,104 \pm 0,009$	$0,179 \pm 0,03$ $<0,05$	$0,168 \pm 0,02$ $<0,05$	$3,92 \pm 0,3$	$4,58 \pm 0,25$	$4,12 \pm 0,37$
Кровь	4-й р	$0,130 \pm 0,02$	$0,185 \pm 0,03$ $<0,001$	$0,073 \pm 0,01$ $<0,001$	$1,62 \pm 0,18$	$1,06 \pm 0,23$	$1,60 \pm 0,18$
	8-й р	$0,130 \pm 0,02$	$0,300 \pm 0,03$ $<0,001$	$0,135 \pm 0,03$ $<0,001$	$1,62 \pm 0,18$	$2,57 \pm 0,23$ $<0,001$	$1,75 \pm 0,19$
	12-й р	$0,130 \pm 0,02$	$0,477 \pm 0,026$ $<0,001$	$0,298 \pm 0,03$ $<0,001$	$1,62 \pm 0,18$	$6,25 \pm 0,73$ $<0,001$	$1,85 \pm 0,08$

мина в печени на 4-й день роста опухоли составляла 70 %, на 8-й день — 46 %, на 12-й день — 23 % уровня витамина в печени интактных животных. Эти данные послужили одним из обоснований для проведения курса витаминотерапии. Введенный витамин оказывает нормализующее действие на пируватдегидрогеназу в ткани печени крыс-опухоленосителей (см. табл. 2). Следует отметить, что активность фермента не достигает уровня, характерного для интактных крыс. Эти данные можно трактовать двояко: вводимая доза тиаминна недостаточна или примененный витамин не единственный фактор, который лимитирует активность фермента в организме животных с опухолями [8]. Активность ключевого фермента гликолиза — пируваткиназы — во все сроки опыта у невитаминизированных животных-опухоленосителей не изменяется. Тиамин оказывает угнетающее действие на этот фермент только в период наиболее интенсивного роста опухоли. Известно, что тиамин не имеет прямого отношения к обмену фосфонолпирувата как кофактор, поэтому полученные результаты можно связывать лишь с какими-то опосредованными эффектами, например вмешательством витамина в обмен макроэргов, контролирующих эту реакцию [5, 19]. Количество молочной кислоты практически не изменялось в печени и резко возрастало в крови крыс-опухоленосителей, не получавших тиаминна. Аналогичные данные приводились в литературе относительно давно [1]. Особенно резкие отличия между двумя опытными группами обнаружили в количестве лактата в крови (см. табл. 1). Показатель этот, всегда весьма резко меняющийся в ходе канцерогенеза [20], практически не отличался от такового, характерного для здоровых животных, если крысам-опухоленосителям инъ-ецировали тиамин. Полученные результаты в какой-то мере можно объ-

Т а б л и ц а 2

Активность ферментов в печени крыс-опухоленосителей (опыт 1) и крыс после введения им тиамин в дозе 12,5 мг/кг (опыт 2) ($M \pm m$)

День исследования	Активность пируватдегидрогеназы, мкмоль в 1 мин на 1 г ткани			Активность пируваткиназы, мкмоль НАД на 1 г ткани			Активность аланин-трансаминазы, мкмоль пирогликоградной кислоты на 1 г ткани за 20 мин		
	контроль	опыт 1	опыт 2	контроль	опыт 1	опыт 2	контроль	опыт 1	опыт 2
4-й	1,15±0,19	0,92±0,22	0,97±0,16	5,7±0,7	5,7±0,7	4,9±0,3	34,5±1,8	40,1±8,5	32,3±1,0
8-й	1,19±0,11	0,86±0,1	0,67±0,06	5,9±0,7	5,4±0,9	3,2±0,4	34,2±3,3	17,5±1,6	23,3±2,8
P			<0,01			<0,001		<0,01	<0,01
12-й	1,2±0,15	0,25±0,02	0,76±0,06	5,8±0,6	5,5±0,5	5,4±0,5	34,5±1,8	9,3±0,14	8,6±0,19
P		<0,001	<0,001					<0,01	<0,01

Т а б л и ц а 3

Активность ЛДГ (субстрат — молочнокислый натрий) (в мкмоль НАД на 1 г ткани), соотношение Н- и М-субъединиц ЛДГ в печени крыс-опухоленосителей (опыт 1) и крыс после введения им тиамин в дозе 12,5 мг/кг (опыт 2) ($M \pm m$)

День исследования	Активность ЛДГ			Соотношение Н- и М- субъединиц ЛДГ					
	контроль	опыт 1	опыт 2	контроль		опыт 1		опыт 2	
				Н-субъединицы	М-субъединицы	Н-субъединицы	М-субъединицы	Н-субъединицы	М-субъединицы
4-й	0,13±0,01	0,10±0,01	0,09±0,01	7,4±0,75	92,6±8,6	6,0±0,35	94±8,2	7,4±0,42	92,6±8,1
8-й	0,14±0,02	0,07±0,004	0,08±0,003	9,5±0,7	90,5±9,1	4,4±0,27	95,6±8,4	5,9±0,37	94,1±8,4
P		<0,001	<0,01			<0,001		<0,001	
12-й	0,13±0,01	0,15±0,01	0,11±0,01	9,4±0,87	90,6±10,2	3,2±0,26	96,8±9,3	5,3±0,35	94,7±9,3
P						<0,001		<0,001	

яснить уже отмеченным ранее действием тиаминна на активность пируватдегидрогеназы (см. табл. 2), а также повышением интенсивности окисления пирувата в крови [2]. Эти изменения, однако, недостаточно объясняют наблюдавшуюся картину. По-видимому, следует допустить, что тиамин существенно влияет на обмен пирувата в других тканях и в самой ткани опухоли [2, 8], или предположить, что данный витамин опосредованно действует на активность ЛДГ, а также на количественный состав изоферментного спектра этого фермента. В одной из работ [21] отмечено увеличение как общей активности ЛДГ, так и изоферментов печеночного типа при В₁-недостаточности. У животных с опухолями, получавших тиамин, отмечается нормализация количества Н- и М-субъединиц ЛДГ (см. табл. 3).

При сопоставлении концентрации субстратов с направленностью изменений в изоферментном спектре ЛДГ выявлена определенная зависимость. Уменьшение количества пирувата сопровождается увеличением количества Н-субъединиц в ткани печени (см. табл. 3). Возможно, важным звеном в изменении активности изоферментов ЛДГ являются сдвиги в концентрации субстратов. Известно, что восстановление пирувата в лактат, катализируемое ЛДГ₁ (Н₄), значительно ингибируется уже небольшими концентрациями пирувата [6] в результате субстратного ингибирования и образования непродуктивного тройного комплекса пирувата с НАД- и Н-субъединицами [22].

Полученные данные дают также основания предполагать, что тиамин в организме крыс-опухоленосителей оказывает специфическое действие на все тиаминзависимые ферменты, а не только на пируватдегидрогеназную реакцию, что, возможно, и приводит к нормализации обмена пирувата, дальнейшей утилизации этого субстрата в митохондриях и восстановлению нарушенного общего энергетического цикла клетки. Кроме того, положительный эффект тиаминна, возможно, связан с нормализацией процессов глюконеогенеза в результате полного использования таких субстратов, как лактат и пируват, вместо аминокислот, которые в организме с опухолью используются в основном для синтеза глюкозы [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Шапот В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М., 1975, с. 35, 47.
2. Торбинский А. М. Некоторые стороны обмена пировиноградной кислоты при раке легкого. Автореф. дис. канд. Одесса, 1969.
3. Заринь В. Х. — В кн.: Онкопролизм вирусов. Рига, 1969, с. 165.
4. KieSSLing K. H., Lundquist C. G. — «Exp. Cell Res.», 1962, v. 26, p. 189.
5. Островский Ю. М. (ред.). Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты. Минск, 1974, с. 112, 154.
6. Уилкинсон Дж. Изоферменты. М., 1968, с. 72.
7. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1966, с. 318, 418.
8. Саввов В. И. Особенности фиксации S³ липоата и окисление пирувата мембранными структурами малигнизированных клеток. Автореф. дис. канд. Одесса, 1975.
9. Tsigimbas A., Stich W. — «Blut», 1961, Bd 7, S. 222.
10. Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965, с. 327, 333.
11. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971, с. 109, 189.
12. Reitman S., Frankel S. — «Am. J. clin. Path.», 1957, v. 28, p. 56.
13. Gubler C. I. — «J. biol. Chem.», 1961, v. 236, p. 3112.
14. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., 1971, с. 189.
15. Fritz P. I., Morrison W. I., White E. L. — «Analyt. Biochem.», 1970, v. 36, p. 443.
16. Монцевичюте-Эрингене Е. — «Пат. физиол.», 1964, № 4, с. 71.
17. Harding H. R., Kosen F., Nichd C. A. — «Cancer Res.», 1964, v. 24, p. 1318.
18. Бутов В. И. Баланс тиаминна, рибофлавина, никотиновой и аскорбиновой кислот при экспериментальной химиотерапии персизиваемой опухоли. Автореф. дис. канд. Рязань, 1973.
19. Мойсеева М. В. — «Успехи биол. химии», 1976, т. 17, с. 127.
20. Block I. B. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1974, v. 230, p. 94.
21. — Qutrin W., Safo lu G. — «Arch. Fisiol.», 1965, v. 64, p. 126.
22. Сурбובה Н. П. Изучение механизма образования непродуктивного тройного комплекса лактатдегидрогеназы НАД — пируват. Автореф. дис. канд. М., 1974.

Поступила 20/IV 1977 г.

THIAMINE THERAPY AND PYRUVATE METABOLISM IN TUMOR CARRYING RATS

M. G. Velichko, Yu. M. Ostrovsky, R. V. Trebukhina

Department of Metabolism Regulation, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

Correlation between pyruvate and lactate contents as well as between enzymes participating in turnover of the substrates (pyruvate- and lactate dehydrogenases, alanine aminotransferase, pyruvate kinase) were studied in rat liver tissue simultaneously with tumor growth and intensive thiaminotherapy. Thiamine, administered into rats carrying carcinosarcoma Woker-256 at a daily dose 12.5 mg/kg body weight, exhibited the normalizing effect on activity of enzymes studied, on quantitative content of LDH isoenzymes and on content of lactate in blood and of pyruvate in liver tissue. Possible effect of thiamine on pyruvate metabolism in tumoral impairment is discussed.

УДК 616.981.553-092.9-07:616.24-008.4-092-07

В. В. Моррисон

ОБ ИЗМЕНЕНИИ УРОВНЯ ГИСТАМИНА И СЕРОТОНИНА В АППАРАТЕ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ ПРИ БОТУЛИНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КОШЕК

Кафедра патологической физиологии им. А. А. Богомольца Саратовского медицинского института

Общая ботулиническая интоксикация у кошек, сопровождающаяся тяжелой дыхательной недостаточностью, характеризуется резкими нарушениями метаболизма гистамина и серотонина в аппарате внешнего дыхания. При местных формах ботулинической интоксикации, когда имеет место лишь односторонний паралич диафрагмы и межреберных мышц, обнаружено отчетливое повышение содержания гистамина в пораженных мышцах и регионарных им отделах спинного мозга. Содержание серотонина повышалось в исследуемых тканях лишь на поздних стадиях местной ботулинической интоксикации.

Клиническая картина ботулинической интоксикации характеризуется развитием паралича скелетной и в первую очередь дыхательной мускулатуры [1—3]. Паралитическое действие токсина ботулизма на моторную иннервацию обусловлено действием яда на двигательные нейроны спинного мозга [4, 5] и блокированием освобождения ацетилхолина с пресинаптических образований холинергических синапсов [6, 7].

Исходя из важной модулирующей роли гистамина и серотонина в процессах освобождения ацетилхолина в холинергических синапсах [8—12], влияния их на процессы клеточной проницаемости, электрогенеза [13—16] и функцию дыхания [17], представляло интерес выяснить, как изменяется содержание указанных биологически активных веществ в аппарате внешнего дыхания при ботулинической интоксикации.

Методика

Опыты проводили на 65 кошках массой 2,5—4 кг. Ботулинический токсин типа С (1 ДЛМ для мыши — 0,0006 мг сухого токсина) вводили внутривенно в дозе 2,2 мг/кг для получения общей формы интоксикации. Исследования проводили через 3 сут на фоне генерализованного паралитического синдрома. Для получения местной формы интоксикации ботулинический токсин вводили односторонне в межреберные мышцы и диафрагму в дозе 0,15 мг/кг. Через сутки развивался паралич лишь указанных мышц. Исследования проводили на ранней (4—5 сут) и поздней (14—15 сут) стадиях ботулинической интоксикации.

Содержание биогенных аминов в тканях определяли спектрофлуориметрическими методами: гистамин — с использованием ортофталевого альдегида [18], серотонин — с пингидрином [19].

Результаты и обсуждение

В предварительных опытах было изучено содержание гистамина и серотонина у здоровых животных, а также у кошек через 4 сут после введения в диафрагму и межреберные мышцы 0,2 мл стерильного физиологи-

ческого раствора. Так как у животных этих групп содержание биологически активных веществ статистически не различалось, то они были объединены в одну контрольную группу.

При генерализованном ботулизме, сопровождавшемся развитием тяжелой дыхательной недостаточности, у экспериментальных животных увеличивалось содержание гистамина в межреберных мышцах, шейном и грудном отделах спинного мозга и снижался его уровень в диафрагме (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Изменение содержания гистамина (в мкг на 1 г ткани) при экспериментальной ботулинической интоксикации у кошек

Исследуемая ткань	Контроль	Общий ботулизм	Местный ботулизм	
			ранняя стадия	поздняя стадия
Диафрагма	0,45±0,049 (19)	0,26±0,035 (10)	0,58±0,035 (20)	0,88±0,091 (10)
<i>P</i>		<0,01	<0,001	<0,001
Межреберные мышцы	0,31±0,013 (17)	0,52±0,051 (10)	0,54±0,029 (10)	0,53±0,058 (9)
<i>P</i>		<0,001	<0,001	<0,01
Спинной мозг (шейный отдел)	0,25±0,01 (15)	0,74±0,081 (9)	0,34±0,014 (10)	1,09±0,22 (10)
<i>P</i>		<0,001	<0,001	<0,001
Спинной мозг (грудной отдел)	0,38±0,017 (12)	0,76±0,046 (9)	0,45±0,019 (10)	1,07±0,201 (10)
<i>P</i>		<0,001	<0,001	<0,001

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: в скобках — число наблюдений, *P* рассчитано по сравнению с контролем.

Т а б л и ц а 2

Изменение содержания серотонина (в мкг на 1 г ткани) при экспериментальной ботулинической интоксикации у кошек

Исследуемая ткань	Контроль	Общий ботулизм	Местный ботулизм	
			ранняя стадия	поздняя стадия
Диафрагма	0,95±0,035 (20)	0,83±0,068 (10)	0,71±0,04 (9)	1,17±0,054 (10)
<i>P</i>		>0,1	<0,001	<0,001
Межреберные мышцы	0,72±0,033 (20)	0,87±0,031 (10)	0,74±0,034 (10)	1,38±0,047 (10)
<i>P</i>		<0,01	>0,5	<0,001
Спинной мозг (шейный отдел)	1,72±0,074 (16)	1,41±0,188 (10)	1,08±0,038 (10)	2,16±0,145 (10)
<i>P</i>		>0,1	<0,001	<0,001
Спинной мозг (грудной отдел)	1,5±0,04 (16)	1,8±0,114 (10)	1,14±0,057 (9)	2,32±0,27 (10)
<i>P</i>		<0,01	<0,001	<0,001

Наряду с этим отмечено увеличение содержания серотонина в межреберных мышцах и соответствующих грудных сегментах спинного мозга. Количество серотонина в диафрагме и шейном отделе спинного мозга при генерализованном паралитическом синдроме при ботулизме не претерпевало значительных изменений по сравнению с контролем (табл. 2).

Таким образом, развитие генерализованной ботулинической интоксикации характеризуется выраженными изменениями содержания гистамина и серотонина в различных тканях аппарата внешнего дыхания.

Развитие общей ботулинической интоксикации сопровождается тяжелой дыхательной недостаточностью и респираторным ацидозом [20, 21],

которые, как известно, могут играть определенную роль в изменении содержания биогенных аминов [22]. Поэтому для исключения роли гипоксического фактора в нарушении содержания гистамина и серотонина мы и изучали содержание указанных веществ при местной форме ботулинической интоксикации, когда отмечалось лишь одностороннее поражение дыхательных мышц. Учитывая данные о возможности распространения токсина ботулизма по нервным стволам в спинной мозг [23, 24], мы определяли содержание биогенных аминов не только в пораженных мышцах, но и в соответствующих сегментах спинного мозга.

Как видно из табл. 1 и 2, на ранней стадии местного ботулизма имеет место отчетливое повышение концентрации гистамина во всех изучаемых тканях. На этой стадии отмечено также некоторое снижение уровня серотонина в диафрагме, шейном и грудном отделах спинного мозга.

Более выраженные нарушения обмена гистамина обнаружены в аппарате внешнего дыхания на поздней стадии местной интоксикации, когда его содержание еще больше увеличивалось и было довольно высоким, особенно в нервной ткани. Через 14—15 сут после внутримышечного введения токсина ботулизма в сублетальных дозах в отличие от ранней стадии интоксикации отмечено значительное накопление серотонина в дыхательных мышцах и регионарных им отделах спинного мозга.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что введение ботулинического токсина сопровождается закономерными изменениями содержания гистамина и серотонина как при общих формах интоксикации, осложненных развитием асфиксического синдрома, так и при местных, не сопровождающихся развитием выраженной гипоксической гипоксии. Последнее дает основание думать, что гипоксический фактор не играет доминирующей роли в механизмах нарушения обмена гистамина и серотонина при ботулинической интоксикации.

Учитывая исключительно широкий спектр действия гистамина и серотонина, можно предположить, что обнаруженные нами изменения метаболизма биологически активных субстанций в нервной и мышечной ткани могут иметь отношение к нарушениям функционального состояния нервно-мышечного аппарата, имеющим место при ботулинической интоксикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрисимов В. И. — «Арх. пат.», 1956, № 1, с. 86. — 2. Попова Л. М. — «Клин. мед.», 1964, № 2, с. 83. — 3. Cherington M. — «Arch. Neurol. (Chic.)», 1974, v. 30, p. 432. — 4. Михайлов В. В., Королев В. В. — «Бюлл. exper. биол.», 1968, № 11, с. 24. — 5. Михайлов В. В., Михайлова С. Д. — Там же, 1964, № 1, с. 36. — 6. Brooks V. B. — «J. Physiol. (Lond.)», 1956, v. 134, p. 264. — 7. Thesleff S. — Ibid., 1960, v. 151, p. 598. — 8. Комиссаров И. В., Талалаенко А. Н. — «Фармакол. и токсикол.», 1969, № 2, с. 231. — 9. Полетаев Г. И. — «Физиол. ж. СССР», 1969, № 5, с. 583. — 10. Colombo F., Rahamimoff R., Stefani E. — «Europ. J. Pharmacol.», 1968, v. 3, p. 252. — 11. Schwartz J.-C. — In: International Congress Pharmacology. 6th. Abstracts. Sect. I. Helsinki, 1975, p. 276. — 12. Scuka M., Zatti P. — «Boll. Soc. ital. Biol. sper.», 1970, v. 46, p. 78. — 13. Вайсфельд И. Л. — «Успехи физиол. наук», 1970, № 3, с. 51. — 14. Воронцовский Е. Г., Игнатова В. Б., Ходоров Б. И. — «Бюлл. exper. биол.», 1974, № 11, с. 23. — 15. Давыдова М. А., Мангушев Р. Г. — В кн.: Исследования по бионике. Вып. 2. Казань, 1972, с. 31. — 16. Волкова И. Н., Базаревич Г. Я., Лихтенштейн А. О. и др. — В кн.: Физиологическая роль медиаторов. Казань, 1972, с. 45. — 17. Shore P. A., Burkhalter A., Cohn V. H. — «J. Pharmacol. exp. Ther.», 1959, v. 127, p. 182. — 18. Snyder S. H., Axelrod J., Zweig M. — «Biochem. Pharmacol.», 1965, v. 14, p. 831. — 19. Матковский В. С., Цыбуляк Г. Н., Зубик Т. М. и др. — «Пат. физиол.», 1971, № 3, с. 16. — 20. Михайлова С. Д. — «Труды Саратовск. мед. ин-та», 1973, т. 82 (99), с. 94. — 21. Garcia-Perez F., Lucas-Gallego J. — «Rev. esp. Fisiol.», 1967, v. 23, p. 161. — 22. Haberman E. — «Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.», 1974, Bd 281, S. 47. — 23. Wiegand H., Erdmann G., Wellhöner H. H. — Ibid., 1976, Bd 292, S. 161. — 24. Scuka M. — «Life Sci.», 1971, v. 10, Pt 1, p. 355.

Поступила 28/IV 1977 г.

ON ALTERATION IN HISTAMINE AND SEROTONIN CONTENT IN EXTERNAL RESPIRATORY SYSTEM OF CATS WITH BOTULINIC INTOXICATION

V. V. Morrison

A. A. Bogomoletz Chair of Pathophysiology, Medical School, Saratov

General botulinic intoxication in cats, accompanied by severe respiratory insufficiency, was characterized by distinct impairments in histamine and serotonin metabolism in external respiratory system. Pronounced increase in content of histamine was observed in impaired muscles and their corresponding regional centers of medulla spinalis, when botulinic intoxication had the local type with unilateral paralysis of diaphragm and intercostal muscles. Content of serotonin was increased in the tissues studied only at the later steps of local botulinic intoxication.

УДК 617.735-002.156.092.9-07:617.735-008.931:577.152.314

А. А. Усова, И. А. Остапенко, Р. Н. Этингер

БЕЛКОВЫЙ ИНГИБИТОР ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В СЕТЧАТКЕ ПРИ ЕЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград

У крыс с наследственной дегенерацией сетчатки (линии Hunter и Campbell) термостабильная фракция белков этой ткани, полученная от 2—3-месячных животных, обладала крайне слабым ингибиторным свойством или совсем не тормозила активность фосфодиэстеразы (ФДЭ). Аналогичные фракции, полученные из сетчатки крыс линии Wistar, кролика, лягушки и миноги, подобно сетчатке быка, содержали компонент, тормозящий активность фермента. В течение постнатальной жизни (с 12-го дня до 3-го месяца) содержание ингибиторного компонента в сетчатке здоровых крыс существенно уменьшалось. Электрофоретическое распределение термостабильных белков сетчатки было различным у больных и здоровых крыс 8—10-месячного возраста и отличалось от такового у здоровых животных. У больных крыс полосы, соответствующие ингибиторному компоненту, были менее выражены, элюат белка из этих полос или активировала ФДЭ (линия Campbell), или не влияла на активность фермента (линия Hunter).

Наследственная дегенерация сетчатки (пигментный ретинит) — одно из тяжелых заболеваний, обуславливающих слепоту у человека. Причина и механизм развития болезни остаются пока неизвестными. Подобные наследственные заболевания, связанные с деструкцией фоторецепторов, приводящие к прогрессирующей потере зрения, описаны и у ряда животных, в частности крыс и мышей. Получено несколько линий крыс (с пигментированными и непигментированными глазами), у которых течение болезни в значительной мере сходно с таковым у людей [1, 2]. В опытах на этих животных выявлено биохимические изменения, происходящие при развитии болезни [3, 4]. Показано, что одним из ранних признаков заболевания является нарушение обмена циклических нуклеотидов в сетчатке; при этом существенно уменьшается активность фермента, обуславливающего распад нуклеотидов, — фосфодиэстеразы (ФДЭ) [5—7].

Ранее в сетчатке быка нами был обнаружен особый характерный для этой ткани белок, по ряду свойств сходный с активатором ФДЭ мозга, но являющийся ингибитором фермента [8, 9]. Учитывая возможную роль нарушений обмена циклических нуклеотидов в развитии болезни и специфичность для сетчатки белка — ингибитора ФДЭ, представляло интерес выяснить вопрос о наличии этого белка в сетчатке больных крыс в процессе развития заболевания. Параллельно подобное исследование проводили на здоровых крысах, поскольку наличие белка — ингибитора ФДЭ — ранее было обнаружено только в сетчатке быка. Кроме здоровых крыс, для изучения вопроса о наличии ингибитора использовали сетчатку ряда других животных.

Объектом исследования являлась сетчатка крыс линии Wistar, крыс с наследственной дегенерацией сетчатки линии Hunter (пигментированные глаза) и линии Campbell (непигментированные глаза), а также сетчатка крупного рогатого скота, кроликов, лягушек и миног. Приготовление гомогената сетчатки, выделение термостабильной фракции белка «супернатант рН 5,9», определение активности ФДЭ, определение фосфата и белка в электрофорез белков термостабильной фракции проводили, как в работах [8, 9].

В предварительных опытах было показано, что 90—95% термостабильных белков экстрагируется в «супернатант рН 5,9» при однократной обработке сетчатки крыс.

Ингибиторное действие белков термостабильной фракции проверяли на частично очищенном препарате ФДЭ мозга [10], удельная активность которого была равна 55 имоль цАМФ на 1 мг белка в мин. Ингибиторную активность фракции термостабильных белков сетчаток выражали в количестве белка (в микрограммах), необходимого для 50% торможения активности фермента (I_{50}). Суммарное количество белка-ингибитора в сетчатке (в условных единицах) рассчитывали как отношение всего количества термостабильного белка в сетчатке к I_{50} . Для сравнения содержания ингибитора в сетчатке крыс разного возраста в ряде опытов рассчитывали его количества на единицу площади сетчатки (100 мм²). Площадь сетчатки принимали равной половине площади глазного яблока.

С целью идентификации ингибиторного компонента в термостабильной фракции белков сетчатки после электрофоретического разделения белков участки гелей, соответствующие отдельным белковым полосам, вырезали, гомогенизировали в воде, осаждали гель (при 10 000 g в течение 20 мин), надосадочную жидкость концентрировали путем испарения в токе воздуха и проверяли ингибиторное действие отдельных элюатов на активность ФДЭ.

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 выясняли, обладают ли термостабильные фракции белков сетчатки разных животных (подобно аналогичной фракции сетчатки быка) ингибирующим действием на активность ФДЭ. Из результатов,

Т а б л и ц а 1
Влияние «супернатантов рН 5,9» из сетчатки разных животных на активность ФДЭ ($M \pm m$)

Животное	Число опытов и использованных животных (в скобках)	I_{50} , мкг
Кролик	3 (7)	56 ± 4
Лягушка	5 (50)	69 ± 9
Минога	2 (30)	85 ± 6
Крыса линии Wistar (возраст 3 мес)	4 (16)	52 ± 8

приведенных в табл. 1, в которой суммированы данные о влиянии «супернатантов рН 5,9», полученных из сетчатки изученных животных, на активность ФДЭ, следует, что все препараты обладали ингибиторным действием. Следует, однако, отметить, что во всех случаях для 50 % торможения активности фермента необходимо было относительно большое количество белка. Это обстоя-

тельство могло быть связано с применением неочищенных фракций термостабильных белков, содержащих наряду с ингибитором много других белков [8], а также с качеством препарата ФДЭ.

Указывалось, что при наследственной дегенерации сетчатки на ранних стадиях болезни выявлено нарушение обмена циклических нуклеотидов в этой ткани, в частности уменьшение активности ФДЭ [5—7]. В связи с этим представляло интерес выяснить, сохраняется ли в пораженной сетчатке ее специфический белок, связанный с ФДЭ-системой [9], т. е. ингибитор фермента, и если это подтвердится, то выявить динамику изменений его активности в процессе развития заболевания. Изучение этого вопроса проводили параллельно на двух линиях больных крыс, отличающихся по скорости развития заболевания и соответственно по степени нарушений в обмене циклических нуклеотидов в отдельные периоды болезни [6], а также по наличию пигмента в эпителии глаза.

В качестве контроля использовали крыс линии Wistar, выявляя наличие в сетчатке у них ингибиторного компонента в те же сроки постнатального развития, что и у больных животных.

Полученные результаты по наличию ингибитора, выходу белка в термостабильную фракцию и общему содержанию ингибитора в сетчатках больных и здоровых животных представлены в табл. 2.

Очевидно, что ингибиторные свойства «супернатантов рН 5,9» (оцениваемые по I_{50}) сетчатки здоровых крыс, существенно не менялись в возрасте от 12 дней до 1 года. Количество термостабильных белков, извлекаемое из сетчатки, резко снижалось к 1-му месяцу жизни, а затем, к 3-му месяцу, относительно стабилизировалось. Указанные изменения приводили к постепенному уменьшению относительного количества ингибитора в сетчатке.

Т а б л и ц а 2

Влияние «супернатантов рН 5,9» на активность ФДЭ и содержание белков в термостабильной фракции сетчатки крыс разного возраста — здоровых (линия Wistar) и больных (линии Hunter и Campbell) ($M \pm m$)

Возраст животных	Число опытов и использованных животных (в скобках)		I ₅₀ , мкг		Общие количество белка в термостабильной фракции на 100 мм ² сетчатки, мкг		Количество ингибитора на 100 мм ² сетчатки, усл. ед.	
	линия крыс							
	Wistar	Hunter	Wistar	Hunter	Wistar	Hunter	Wistar	Hunter
10 дней	—	2 (11)	—	37	—	156	—	4,6
12 дней	2 (9)	—	44	—	302	—	8,2	—
14 дней	1 (4)	—	40	—	387	—	9,1	—
15—16 дней	3 (15)	—	59	—	374	—	5,4	—
1 мес	3 (17)	3 (15)	50±2	40±5	100	55	2,0	1,4
1½ мес	3 (11)	3 (15)	42±3	38±2	73	70	1,7	1,8
2 мес	3 (13)	3 (12)	50±7	315±39	90	272	1,8	0,9
2½ мес	2 (8)	4 (17)	49±4	147±17	55	70	1,1	0,5
3 мес	3 (12)	3 (14)	52±8	197±12	35	48	0,7	0,2
6 мес	2 (8)	—	60	—	33	—	0,5	—
11 мес	2 (7)	—	60	—	30	—	0,5	—
линия Campbell								
2 мес	1 (22)		140				0,23	
2½ мес	2 (8)		200				0,23	
3½ мес	3 (20)		не обнаружено				Не обнаружено	

У больных крыс линии Hunter ингибиторная активность до 1½-месячного возраста была примерно такой же, как у здоровых, а затем резко снижалась (для I_{50} требовалось в 4—8 раз больше белка); при этом количество термостабильных белков в сетчатке резко возрастало у 2-месячных животных. В остальные изученные сроки жизни разница в показателе у больных и здоровых крыс была не столь выражена.

Увеличение I_{50} может быть результатом как снижения ингибиторной активности, так и уменьшения содержания ингибиторного компонента во фракции из-за увеличения доли других термостабильных белков. При сравнении результатов у больных крыс 2-месячного возраста (см. табл. 2) можно предположить, что в данном случае оба фактора объясняют указанный феномен. Сопоставляя содержание ингибиторного компонента в единицу площади сетчатки у больных животных этой линии и у здоровых крыс, обращает на себя внимание резкое уменьшение его количества у животных 1½—3 мес жизни (см. табл. 2).

Нужно отметить, что у крыс линии Campbell наблюдается полное отсутствие ингибиторной активности в термостабильной фракции сетчатки к 3½ мес жизни, т. е. в тот период, когда в сетчатке крыс линии Hunter еще имеется некоторое количество ингибитора. Связаны ли эти отличия с присутствием гранул пигмента у крыс этой линии или с темпами развития болезни, пока неясно.

Полученные данные об изменениях относительного количества ингибиторного компонента (рассчитанные на площадь сетчатки) в процессе

постнатальной жизни интересно сопоставить с динамикой изменений активности ФДЭ, модулятором которой он является. На рис. 1, а приведены сравнительные данные у здоровых крыс. Величина активности ФДЭ в сетчатке этих животных, определенная ранее [6], рассчитана на 1 мг белка (удельная активность; рис. 1). Как следует из данных [7], характер

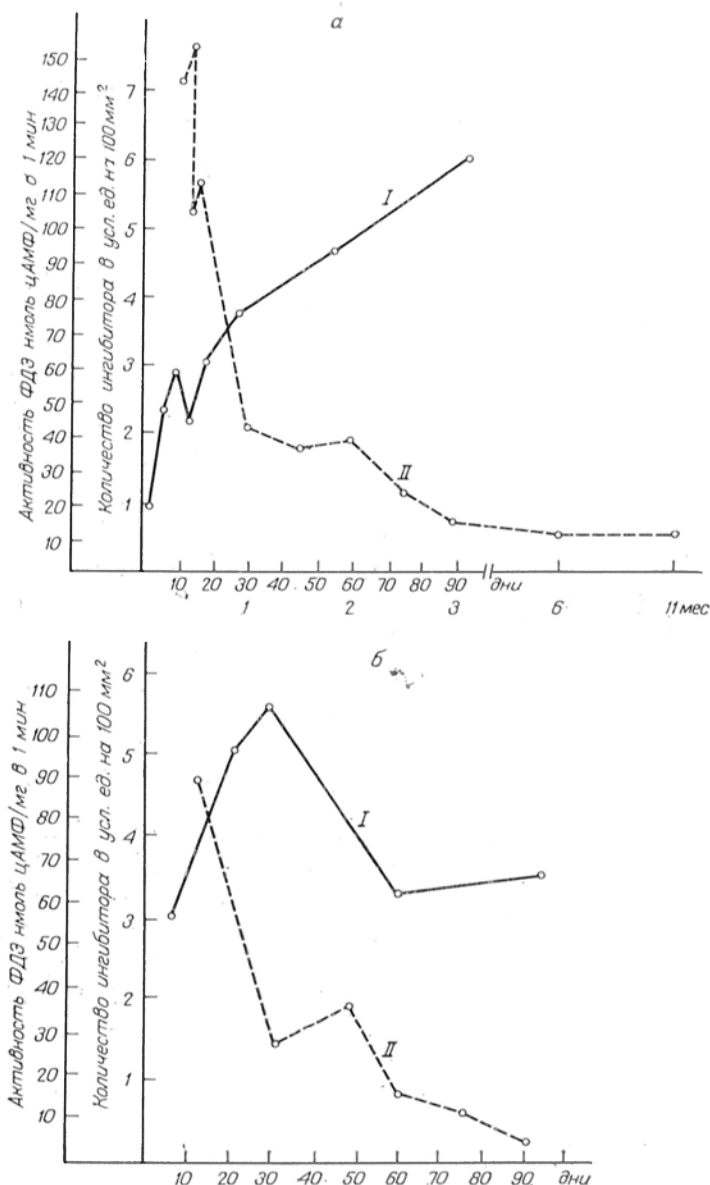


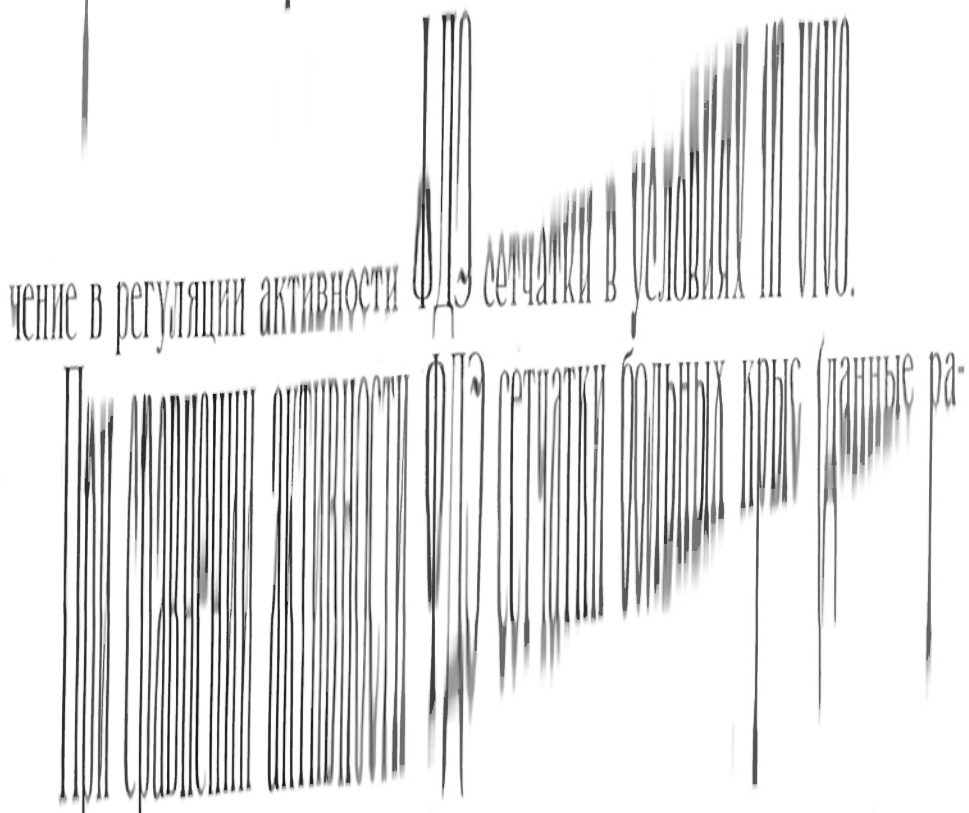
Рис. 1. Активность ФДЭ и содержание ингибитора в сетчатке в течение постнатальной жизни.

а — сетчатка здоровых крыс линии Wistar; б — сетчатка больных крыс линии Hunter. I — активность ФДЭ (данные работы [6]); II — содержание ингибитора, в усл. ед.

колебаний активности ФДЭ в течение постнатальной жизни не меняется при пересчете активности на площадь сетчатки, поэтому кривые на рис. 1 вполне сопоставимы.

Сравнивая величину активности ФДЭ и содержания ингибитора в сетчатке, следует отметить обратную зависимость этих параметров. Как пра-

вило, чем меньше количество ингибитора, тем выше активность ФДЭ, при низкой активности ФДЭ содержание ингибитора высокое. На основании этих фактов можно предполагать, что ингибиторный компонент имеет зна-



боты [6]) с ее ингибиторными свойствами наблюдали примерно такую же картину, как и у здоровых животных (рис. 1, б). Однако сопоставление этих параметров в данном случае, особенно на фоне развития патологии, т. е. после 2 мес жизни, затруднительно, так как у больных животных возможно нарушение и синтеза белка-фермента и повреждение других регулирующих ферментную активность систем.

В следующей серии экспериментов мы пытались выяснить, исчезает ли белок — ингибитор ФДЭ — в сетчатке больных крыс или изменяются лишь свойства белка. С этой целью сравнивали электрофоретическую картину белков «супернатантов рН 5,9», полученных из сетчатки быка, здоровых и больных крыс. В этих экспериментах использовали взрослых животных (в возрасте 8—9 мес). Предварительные опыты показали, что «супернатант рН 5,9», полученный из сетчаток крыс линий Hunter и Campbell этого возраста, не изменял активность ФДЭ, а I_{50} для супернатантов из сетчатки быка и крыс линии Wistar равнялась соответственно 50 и 55 мкг.

По данным, полученным ранее в нашей лаборатории [9], белку-ингибитору должна соответствовать хорошо выраженная полоса (рис. 2, 1) электрофореграммы, расположенная в условиях наших экспериментов ближе к аноду. Действительно, при нанесении на гель термостабильных белков сетчатки быка и крыс линии Wistar наблюдали отчетливое ингибирующее влияние элюатов этой полосы на активность ФДЭ (табл. 3). Белки, элюированные из других зон геля, не обладали подобным свойством.

Электрофореграммы белков термостабильной фракции сетчатки больных животных отличались у крыс линий Hunter и Campbell, а также от картины, характерной для здоровых животных. У крыс линии Hunter в области расположения ингибиторного компонента оставались, как и у здоровых, две полосы, но они были менее выражены. У крыс линии Campbell выявлялась в этой области лишь одна полоса. В то же время на электрофо-

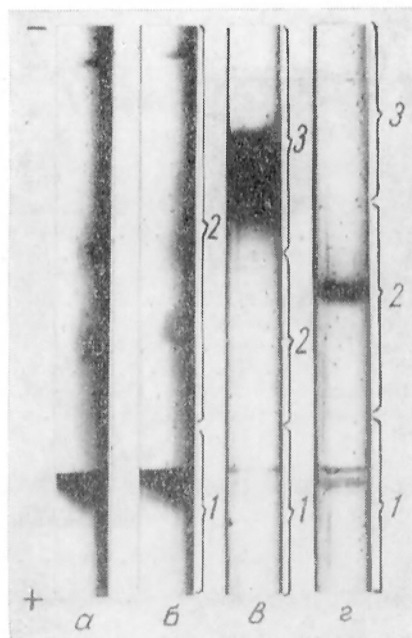


Рис. 2. Гель-электрофорез «супернатантов рН 5,9» из сетчатки разных животных.

а — сетчатка быка; б — крыс линии Wistar; в — крыс линии Campbell; г — крыс линии Hunter.

ментативную активность не наблюдали. Этот факт позволяет полагать, что у больных животных причиной отсутствия ингибиторного действия является изменение свойств этого белка, а не его отсутствие.

Таблица 3
Влияние элюатов белков геля на активность ФДЭ

Номер участка геля, из которого получен элюат (см. рис. 2)	Изменение активности ФДЭ по сравнению с контролем, %		
	Линия крыс		
	Wistar	Campbell	Hunter
1	-75	+81	0
2	0	0	0
3	—	0	0

Совокупность всех полученных результатов свидетельствует о серьезных нарушениях свойств ФДЭ-системы, в частности специфического белка сетчатки — ингибитора фермента. В дальнейших исследованиях предполагается выяснить, в какой степени эти нарушения коррелируют с изменением синтеза и превращениями

родопсина и каковы взаимоотношения белков-модуляторов и фермента ФДЭ у больных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ойзерман М. В. — «Успехи совр. биол.», 1976, т. 81, № 3, с. 365.
2. Yates C. M., Dewar A. J., Wilson H. et al. — «Exp. Eye Res.», 1974, v. 18, p. 119.
3. Graymore C. N. — Ibid., 1964, v. 3, p. 5.
4. Reading H. W. — «J. med. Genet.», 1970, v. 7, p. 277.
5. Lolley R. N., Schmidt S. G., Farber D. G. — «J. Neurochem.», 1974, v. 22, p. 701.
6. Dewar A. J., Barron G., Richmond J. — «Exp. Eye Res.», 1975, v. 21, p. 299.
7. Lolley R. N., Farber D. B. — Ibid., 1976, v. 22, p. 477.
8. Думлер И. Л., Этигноф Р. Н. — «Докл. АН СССР», 1973, т. 213, с. 1197.
9. Dumler I. L., Ettingof R. N. — «Biochim. biophys. Acta», 1976, v. 429, p. 474.
10. Huang Y.-C., Kemp R. G. — «Biochemistry (Wash.)», 1971, v. 10, p. 2278.

Поступила 10/V 1977 г.

PROTEIN INHIBITOR OF CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE IN HEREDITARY DYSTROPHY OF RETINA

A. A. Usova, I. A. Ostapenko, R. N. Ettingof

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

Thermostable protein fraction from retina of rats with hereditary retinal dystrophy (Hunter and Campbell strains) did not inhibit cyclic nucleotide phosphodiesterase. At the same time an inhibitory component, found in retina of Wistar rat, rabbit, frog and lamprey, was similar to the component from bovine retina. Quantity of the inhibitory component in normal rat retina decreased considerably within postnatal period (12 days — 3 months). Thermostable proteins, isolated from Campbell rat retina, differed from that of Hunters' one by electrophoretic properties while both preparations were dissimilar to the protein of normal rat. Protein bands, containing inhibitory component from dystrophic rat retina, appear to be less distinct as compared to those of normal rat. These proteins, eluted from the bands of Campbell rats, activated phosphodiesterase but the preparations from Hunter rats did not influence on it.

УДК 612.6.03:612.35.015.1:577.152.165'133

В. В. Федуров

РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА УБИХИНОНОВ: ИССЛЕДОВАНИЕ В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Центральная научно-исследовательская лаборатория Киевского медицинского института им. А. А. Богомольца

По включению ^{14}C -тирозина в убихинон и $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон и стерины *in vivo* и *in vitro* установлено значительное усиление биосинтеза этих соединений в регенерирующей печени белых крыс без существенных изменений скорости распада убихинона. Путем ве-

дения животным с субтотальной гепатэктомией специфических ингибиторов — циклогексимида, бромистого этидия, окситетрациклина, холестерина и холестерина в сочетании с желчью — и последующего определения относительных скоростей включения меченых предшественников в убихинон и стерины в опытах *in vitro* выявлено ускоренное новообразование в цитоплазме и митохондриях регенерирующей печени ферментов, участвующих в синтезе этих соединений. Наиболее высокая скорость включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон обнаружена через 24 ч, в стерины — через 48 ч, а ^{14}C -тирозина в убихинон — через 48 и 72 ч после гепатэктомии. Высказано предположение о кодировании митохондриальной ДНК функциональных белков, ответственных за синтез убихинона в митохондриях. Подтверждена регуляторная роль в биосинтезе убихинона ферментов, осуществляющих образование в цитоплазме предшественников изопrenoидных соединений. Обсуждается схема регуляции биосинтеза убихинона в регенерирующей печени.

Основные пути биосинтеза и катаболизма убихинона (кофермента Q) — незаменимого компонента дыхательной цепи митохондрий установлены. В цитоплазме из ароматических аминокислот образуется *p*-оксibenзоат, из ацетил-КоА — изопентилпирофосфат, непосредственно на внутренней мембране митохондрии из них синтезируются полипиренилфенолы, а из последних — убихинон. Необратимые изменения этого кофермента начинаются с окисления боковой цепи, часть его фонда выделяется с экскрементами в неизменном виде [1, 2]. Для нормальной жизнедеятельности животных необходим оптимальный для данных условий уровень убихинона в органах, так как преобразование энергии окисления в АТФ зависит от концентрации этого соединения в митохондриях [1]. Выяснение механизмов, регулирующих содержание убихинона в тканях, представляет актуальную и вместе с тем сложную задачу, вследствие крайней ограниченности знаний о свойствах и биогенезе ферментов, осуществляющих образование или разрушение этого соединения, и невысоких скоростей его обмена [3].

Как было установлено нами ранее, одной из удобных моделей для изучения этих механизмов может быть регенерирующая печень белых крыс, в которой наблюдается ускоренное новообразование митохондрий и, по-видимому, убихинона [5, 6]. Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы на основании определения скоростей включения ^{14}C -тирозина и $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон в опытах *in vivo* и *in vitro* выяснить основные факторы, способствующие накоплению убихинона в регенерирующем участке печени. Кроме того, мы попытались, используя специфические ингибиторы: циклогексемид [7], бромистый этидий и окситетрациклин [8—11], холестерин и холестерин в сочетании с желчью [12—14] — установить роль белоксинтезирующих систем различных отделов клетки в активации образования этого кофермента в печени. Принимая во внимание тесную взаимосвязь биогенеза убихинона с другими изопrenoидными соединениями [3], одновременно в этих опытах исследовали и синтез стерина.

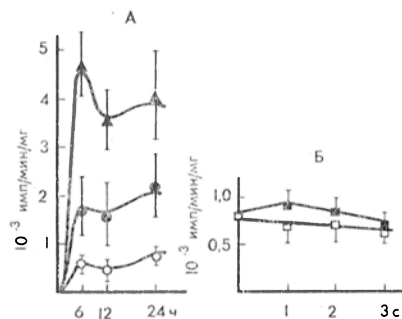
Методика

Опыты проведены на самках белых беспородных крыс весом 140—220 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Под легким эфирным наркозом у крыс удаляли боковую и левую центральную доли печени ($65\pm 5\%$) по Хиггинсу и Алдерсену [15]. «Ложная» гепатэктомия заключалась во вскрытии брюшной стенки и ушивании операционной раны. Животных оперировали и брали в опыт (за некоторым исключением) в одно и то же время — с 9 до 10 ч.

В опытах *in vivo* о скорости биосинтеза или катаболизма убихинона в печени судили по изменению его удельной радиоактивности после внутрибрюшинного введения «импульсной» метки — 1 мкКи на 100 г веса тела равномерно меченого ^{14}C -тирозина (315 мКи/ммоль) фирмы «UVVVR» (ЧССР) в 0,25 мл физиологического раствора или после внутрибрюшинного введения 50 мкКи на 100 г веса тела $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата (9,8 мКи/ммоль) Всесоюзного объединения «Изотоп». Крыс забивали через определенные интервалы времени (см. рисунок, табл. 1) и из печени выделяли несомыляемые липиды.

В опытах *in vitro* о скорости биосинтеза убихинона и стерина судили по включению ^{14}C -тирозина или $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата тонкими срезами удаленных (служили в качестве контроля) или гипертрофированных в течение 24, 48 и 72 ч долей печени крыс с интактной регенерацией или обработанных указанными выше ингибиторами. Водный раствор циклогексимида фирмы «Koch-Light Lab.» (Англия) вводили внутрибрюшинно сразу после операции и повторно через 24 ч из расчета 0,1 мг на 100 г веса тела. В опытах с

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетатом части животным циклогексимид вводили через 24 и 48 ч после гепатэктомии. Бромистый этидий фирмы «Calbiochem» (США) вводили внутривенно из расчета 1 мг на 100 г веса тела [9, 10], повторно ту же дозу вводили через 48 ч. Окситетрациклин пролонгированного действия («Geomycinum») фирмы «Pfizer» (Югославия) вводили внутримышечно сразу после операции и через каждые 12 ч из расчета 10 мг на 100 г веса тела [8—10]. Холестерин Ленинградского мясокомбината начинали скормливать с рационом (2%) ежедневно за 4 дня до гепатэктомии. Эмульсию холестерина в бычьей желчи из расчета 125 мг на 0,5 мл на 100 г веса тела начинали вводить ежедневно внутрь желудка тонким эластичным зондом также за 4 дня до гепатэктомии и продолжали вводить на протяжении всего периода регенерации. Бычью желчь собирали, по возможности, в стерильных условиях от только что убитых животных и хранили при 5°C до употребления.



Изменения удельной радиоактивности убихинона в нормальной и регенерирующей печени после внутривенного введения крысам ^{14}C -тирозина (1 мкКи на 100 г веса тела).

А — в интервале 24 ч после введения: светлые кружки — контроль; темные кружки и треугольники — через 1 и 2 сут после удаления $2/3$ печени соответственно; Б — в течение 3 сут после «ложной» и субтотальной гепатэктомии, соответственно светлые и темные квадраты. ^{14}C -тирозин в этой серии опытов вводили за 24 ч до операции.

хинон-9 очищали до постоянной удельной радиоактивности хроматографированием на пластинках и пленках силуфол. Количество убихинона определяли спектрофотометрически [18].

Т а б л и ц а 1

Включение радиоактивной метки из $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон и стерины в оставшихся после субтотальной гепатэктомии долях печени крыс

Срок после гепатэктомии, ч	Ингибитор	Удельная радиоактивность, имп/мин/мг $\times 10^3$ ($M \pm m$)	
		убихинон	стерины
0	— (8)	$0,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3$
24	— (4)	$1,7 \pm 0,2^*$	$1,9 \pm 0,5$
48	Циклогексимид — (4)	$0,5 \pm 0,1^{**}$	$0,6 \pm 0,1^{**}$
	— (4)	$1,5 \pm 0,3^*$	$1,6 \pm 0,3$
	Циклогексимид повторно (4)	$0,6 \pm 0,1^{**}$	$0,6 \pm 0,1^{**}$
	Бромистый этидий (5)	$2,2 \pm 0,3^*$	$2,8 \pm 0,5$
	Окситетрациклин (4)	$2,9 \pm 1,0^*$	$2,0 \pm 1,0$

* $P \leq 0,05$ по сравнению с крысами, которым $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат вводили сразу после гепатэктомии.

** $P \leq 0,05$ по сравнению с регенерирующей печенью интактных крыс.

Примечание. Здесь и табл. 2—4 в скобках — число определений.

В опытах с $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетатом наряду с убихиноном определяли включение метки в стерины. Предварительно было установлено, что при хроматографировании фракции общих несомыляемых липидов пятна стеринов, осаждаемых дигитонином, на пластинках располагаются ниже убихинона [18]. Поэтому после снятия слоя силикагеля с убихиноном весь сорбент ниже этой полоски очищали в колонку, которую промывали диэтиловым

эфиром. Эфир упаривали в вакууме, остаток растворяли в смеси спирта и ацетона (1 : 1 по объему), прибавляли эквивалентный объем 1% спиртового раствора дигитонина и оставляли на ночь. Осадок стерин-дигитонина промывали до постоянной удельной радиоактивности смесью ацетона и эфира (1 : 1 по объему), растворяли при легком нагревании в метаноле и использовали для определения радиоактивности и количества [18].

Радиоактивность убихинона, выделенного из печени крыс, которым вводили «импульсную» метку ^{14}C -тирозина определяли с помощью сцинтилляционного счетчика («Nuclear-Chicago») в Институте ядерных исследований АН УССР. В остальных случаях радиоактивность убихинона и стерина определяли ранее описанным способом [18]. Результаты обработаны статистическим методом [19].

Результаты и обсуждение

В первые 6 ч после внутрибрюшинного введения ^{14}C -тирозина intactным крысам удельная радиоактивность убихинона значительно повышалась, в интервале 6—24 ч существенно не менялась, а затем равномерно и медленно понижалась (см. рисунок, А). Аналогичную динамику изменения удельной радиоактивности убихинона печени после введения крысам равномерного меченого ^{14}C -*n*-оксибензоата наблюдали Вистанс и соавт. [20]. При введении ^{14}C -тирозина крысам с субтотальной гепатэктомией удельная радиоактивность убихинона оставшихся долей также интенсивно повышалась в интервале 0—6 ч после введения и достоверно не менялась в течение 6—24 ч (см. рисунок, А). Однако абсолютные значения этого показателя у крыс, которым вводили метку через 24 и 48 ч после удаления $2/3$ печени, были соответственно в 2 и 8 раз выше, чем у intactных животных, что, несомненно, свидетельствует о значительном увеличении скорости включения ^{14}C -тирозина в убихинон в регенерирующей печени. Следует отметить колебания удельной радиоактивности убихинона в регенерирующей печени, что обусловлено не только индивидуальными особенностями проницаемости клеточных барьеров, но и, возможно, изменениями всасываемости ^{14}C -тирозина из брюшной полости. Удельная радиоактивность убихинона печени крыс, которым вводили ^{14}C -тирозин и через 24 ч проводили «ложную» гепатэктомию, понижалась равномерно и незначительно в течение 3 сут после операции (см. рисунок, Б). По-видимому, период полужизни убихинона в печени сравним с периодом полужизни митохондриальных белков. Значимых отличий в динамике уменьшения удельной радиоактивности убихинона в регенерирующих долях крыс, которым через сутки после введения метки удаляли $2/3$ печени, обнаружено не было. Иными словами, существенного изменения распада убихинона в регенерирующей печени в это время не наблюдалось. Обнаружено только незначительное (статистически недостоверное) увеличение удельной радиоактивности убихинона через 24 ч после гепатэктомии по сравнению с таковой в удаленных участках. Так как вторичное включение радиоактивного препарата в убихинон маловероятно из-за низкой введенной дозы, этот факт в какой-то мере может отражать неодинаковые скорости обмениваемости митохондриального и микросомального его фондов. Известно, что при введении ^{14}C -*n*-оксибензоата животным максимальное включение метки наблюдается в митохондриальный фонд убихинона [21]. Ранее нами было обнаружено достоверное снижение концентрации этого кофермента в микросомальной фракции регенерирующей печени крыс в первые 3 дня после гепатэктомии [5]. Очевидно, в случае увеличения скорости катаболизма только микросомального фонда «средняя» удельная радиоактивность убихинона должна возрасти.

Включение внутрибрюшинно введенного 1- ^{14}C -ацетата в убихинон регенерирующими долями печени было также достоверно выше у тех крыс, которым метку вводили не сразу, а через 24 и 48 ч после субтотальной гепатэктомии (см. табл. 1). Так как включение радиоактивных предшественников в убихинон в первые часы после их введения отражает в основном скорости его биосинтеза [12], то приведенные выше данные являются веским доказательством того, что образование этого соединения в регенери-

рующей печени значительно увеличивается, тогда как распад и выведение существенно не меняются. Этот вывод подтвердился и в опытах *in vitro*, в которых было обнаружено значительное усиление включения обоих меченых предшественников срезами регенерирующей печени в убихинон в первые 3 дня после субтотальной гепатэктомии (табл. 2, 3). Однако максимальное включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата наблюдалось через 24 ч, тогда как ^{14}C -тирозина — через 48—72 ч. Включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата срезами в стерины достоверно увеличивалось через 48 ч после гепатэктомии. Известно, что ацетат включается только в боковую изопреноидную цепь убихинона, а тирозин — преимущественно в бензохиноновое кольцо [1—3]. В связи с этим выявленные на различных этапах регенерации изменения скоростей включения обоих меченых предшественников срезами свидетельствуют, по-видимому, о неодновременном усилении активности ферментов, осуществляющих различные стадии синтеза этого соединения.

Т а б л и ц а 2

Включение радиоактивной метки из ^{14}C -тирозина в убихинон срезами удаленных и регенерирующих долей печени крыс

Срок регенерации, ч	Ингибитор (число крыс)	Содержание, мкг/г ($M \pm m$)	Удельная активность, имп/мин/мг $\times 10^3$ ($M \pm m$)
0 (удаленные доли)	— (47)	$69,1 \pm 1,3$	$1,7 \pm 0,1$
	Холестерин (3)	$64,1 \pm 1,3$	$2,5 \pm 0,2$
	Холестерин+желчь (3)	$62,1 \pm 1,5$	$1,9 \pm 0,3$
24	— (4)	$60,4 \pm 4,6$	$4,9 \pm 0,7^*$
	Циклогексими́д (4)	$68,9 \pm 3,1$	$1,3 \pm 0,3^{**}$
	Бромистый этидий (4)	$57,5 \pm 2,8$	$5,5 \pm 0,6^*$
	Окситетрациклин (4)	$61,1 \pm 4,4$	$4,5 \pm 1,2^*$
	Холестерин (4)	$64,2 \pm 4,9$	$6,4 \pm 0,9^*$
	Холестерин+желчь (5)	$65,9 \pm 4,9$	$3,3 \pm 0,8$
48	— (5)	$45,3 \pm 5,3$	$7,4 \pm 0,8^*$
	Циклогексими́д повтор- но (2)	$43,7 \pm 5,2$	$2,3 \pm 0,1^{**}$
	Бромистый этидий (5)	$38,3 \pm 7,1$	$6,4 \pm 1,1^*$
	Окситетрациклин (5)	$41,9 \pm 4,7$	$6,1 \pm 1,0^*$
	Холестерин (4)	$57,3 \pm 2,9$	$8,2 \pm 0,9^*$
	Холестерин+желчь (4)	$56,3 \pm 2,5$	$7,2 \pm 0,5^*$
72	— (4)	$62,2 \pm 4,9$	$6,0 \pm 1,4^*$
	Бромистый этидий (6)	$38,6 \pm 4,4^{**}$	$5,6 \pm 0,3^*$
	Окситетрациклин (4)	$40,9 \pm 3,5^{**}$	$4,1 \pm 0,3^*$
	Холестерин (4)	$59,3 \pm 5,4$	$4,9 \pm 0,9^*$
	Холестерин+желчь (4)	$52,3 \pm 5,4$	$2,8 \pm 0,7^{**}$

* Здесь и в табл. 3 $P \leq 0,05$ по сравнению с контрольными срезами.

** Здесь и в табл. 3 $P \leq 0,05$ по сравнению со срезами из регенерирующей печени интактных крыс.

Активность ферментов регулируется путем изменения скоростей синтеза или деградации ферментных белков либо путем прямого взаимодействия какого-либо эффектора с молекулами ферментов. Возможно, все три механизма контролируют биосинтез убихинона. Однако в условиях пространственной разобщенности этих ферментов обнаруженные на разных этапах регенерации печени существенные различия скоростей включения ^{14}C -тирозина и $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон и стерины в опытах *in vivo* и *in vitro* могут свидетельствовать о том, что изменение их синтеза в различных отделах клетки осуществляется неодновременно. Необходимо отметить, что для биогенеза функциональных белков митохондрий требуется кооперативное действие ядерного и митохондриального геномов [22]. Для проверки высказанного предположения крысам вводили циклогексими́д — ингибитор цитоплазматического синтеза белка [7], бромистый этидий и окситетрациклин — ингибиторы синтеза белка в митохондриях [8—11], холестерин и холестерин с желчью, являющихся ретроингибиторами синтеза сте-

ринов [12—14], и определяли скорости образования убихинона по включению ^{14}C -тирозина и $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата срезами печени.

Циклогексимид, введенный сразу после операции, практически полностью подавлял увеличение веса оставшихся долей печени (табл. 4), по-видимому, за счет значительного угнетения митотического деления гепатоцитов [23]. Остальные препараты существенного влияния на восстановление веса печени не оказали.

Т а б л и ц а 3

Включение радиоактивной метки из $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон и стерины срезами удаленных и регенерирующих долей печени крыс

Срок регенерации, ч	Ингибитор	Удельная радиоактивность, имп/мин/мг $\times 10^3$ ($M \pm m$)	
		убихинон	стерины
0 (удаленные доли)	— (26)	$1,0 \pm 0,1$	$9,6 \pm 1,0$
	Холестерин (4)	$5,4 \pm 3,2$	$4,9 \pm 5,0$
	Холестерин+желчь (8)	$1,1 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,3^*$
24	— (4)	$9,3 \pm 3,3^*$	$12,2 \pm 2,9$
	Циклогексимид (5)	$1,2 \pm 0,1^{**}$	$4,0 \pm 1,8^{**}$
	Холестерин (4)	$44,0 \pm 14,0^{**}$	$2,9 \pm 2,3^*$
	Холестерин+желчь (4)	$3,8 \pm 0,6^*$	$4,5 \pm 2,8$
48	— (7)	$5,4 \pm 1,2^*$	$22,1 \pm 0,2^*$
	Циклогексимид повторно (2)	$1,1 \pm 0,3^{**}$	$5,0 \pm 0,7^{**}$
	Циклогексимид за 24 ч до декаптации (4)	$4,4 \pm 0,7^*$	$4,6 \pm 1,5^{**}$
	Бромистый этидий (6)	$6,7 \pm 1,2^*$	$46,0 \pm 0,2^{**}$
	Окситетрациклин (4)	$4,3 \pm 1,9$	$16,9 \pm 7,1^*$
	Холестерин (4)	$6,3 \pm 0,4^*$	$15,8 \pm 8,7$
	Холестерин+желчь (4)	$7,2 \pm 0,9^*$	$4,0 \pm 1,7^{**}$
	— (9)	$6,5 \pm 0,6^*$	$16,6 \pm 3,3^*$
72	Циклогексимид за 24 ч до декаптации (9)	$4,0 \pm 0,1^{**}$	$5,6 \pm 1,6^{**}$
	Бромистый этидий (4)	$6,3 \pm 0,3^*$	$20,3 \pm 5,0^*$
	Окситетрациклин (4)	$4,5 \pm 1,2$	$21,4 \pm 7,1^*$
	Холестерин (4)	$6,1 \pm 0,5^*$	$6,7 \pm 2,7^{**}$
	Холестерин+желчь (4)	$2,7 \pm 1,7$	$1,9 \pm 0,5^{**}$

Концентрация убихинона в пересчете на 1 г сырого веса ткани в регенерирующих долях печени оказалась несколько ниже, чем в удаленных (см. табл. 2). Однако в пересчете на общий вес оставшихся долей его количество в первые 3 дня после гепатэктомии, несомненно, нарастало [5]. Не было выявлено существенного изменения концентрации убихинона в расчете на 1 г сырого веса при введении холестерина и холестерина с желчью, тогда как бромистый этидий и окситетрациклин вызвали достоверное уменьшение концентрации убихинона через 72 ч после операции.

Введение циклогексимида крысам сразу после операции и повторно через 24 ч практически полностью снижало активацию включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон и стерины и ^{14}C -тирозина в убихинон в опытах *in vivo* и *in vitro*, что является убедительным доказательством усиления образования в регенерирующей печени ферментов, принимающих участие в синтезе общих предшественников убихинона и стерина. При введении этого антибиотика через 24 и 48 ч после гепатэктомии включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в убихинон срезами подавлялось незначительно, тогда как в стерины — значительно. Возможно, этот эффект свидетельствует об усилении образования в митохондриях ферментов, ответственных за синтез убихинона.

При скормливания крысам холестерина — аллостерического ингибитора β -окси- β -метилглутарил-КоА-редуктазы [12—14], осуществляющей синтез мевалоновой кислоты, — ключевого предшественника изопреноидных соединений, было обнаружено более эффективное включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -

ацетата и ^{14}C -тирозина в убихинон, особенно в 1-е сутки регенерации, и выраженное угнетение включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в стерины (см. табл. 2, 3) срезами как контрольных, так и регенерирующих долей печени. При введении холестерина в сочетании с желчью не было выявлено изменений включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата и ^{14}C -тирозина в убихинон контрольными срезами (см. табл. 2, 3). Однако включение метки этими срезами в стерины было подавлено. В срезах регенерирующих долей печени крыс, получавших холестерин с желчью, включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в стерины было достоверно снижено в течение всего периода изучения, тогда как включение обоих предшественников в убихинон снижалось только через 72 ч после операции. Эффект от введения крысам холестерина и холестерина с желчью на включение меток в убихинон и стерины срезами печени оказался несколько неожиданным.

Т а б л и ц а 4

Влияние ингибиторов биосинтеза белка и стерина в отношении относительного увеличения веса регенерирующих долей печени (отношение $\frac{\text{вес регенерирующих долей}}{1/2 \text{ веса удаленных долей}}$; $M \pm m$)

Ингибитор	Срок после гепатэктомии, ч			
	4	24	48	72
—	$1,19 \pm 0,06$ (8)	$1,47 \pm 0,08^*$ (10)	$2,06 \pm 0,06^*$ (20)	$2,47 \pm 0,09^*$ (25)
Циклогексимид (повторно)	—	$1,20 \pm 0,09^{**}$ (8)	$1,35 \pm 0,03^{**}$ (4)	—
Циклогексимид за 24 ч до деканитации	—		$1,82 \pm 0,14$ (4)	$2,97 \pm 0,04$ (4)
Бромистый этидий	—	$1,57 \pm 0,14$ (4)	$2,11 \pm 0,10$ (16)	$2,33 \pm 0,05$ (18)
Окситетрациклин	—	$1,68 \pm 0,12$ (4)	$1,98 \pm 0,09$ (17)	$2,50 \pm 0,11$ (12)
Холестерин	—	$1,43 \pm 0,01$ (4)	$1,85 \pm 0,01$ (4)	$2,43 \pm 0,03$ (4)
Холестерин+желчь	—	$1,42 \pm 0,16$ (9)	$1,96 \pm 0,10$ (8)	$2,39 \pm 0,18$ (8)

* $P \leq 0,05$ по сравнению с крысами, забитыми через 4 ч после гепатэктомии.

** $P \leq 0,05$ по сравнению с соответствующим сроком регенерации интактных крыс.

Обнаруженную нами активацию включения в убихинон меченых предшественников срезами нормальной и особенно регенерирующей печени крыс, получавших холестерин и холестерин с желчью, трудно объяснить с точки зрения ингибирования ими только β -окси- β -метилглутарил-КоА-редуктазы [24]. Недавно Вис [25] установил, что скормливание холестерина крысам приводит к нарушению в печени синтеза этого соединения из ланостерина. Этот факт дает возможность предполагать, что даже при значительном ингибировании активности β -окси- β -метилглутарил-КоА-редуктазы экзогенным холестерином [24] включение меток в убихинон должно быть более эффективным, чем в стерины [12]. Более интенсивное включение метки в убихинон в регенерирующей печени крыс, получавших холестерин, может свидетельствовать и о повышении активности ферментов, осуществляющих терминальные стадии образования убихинона в митохондриях. Следует отметить, что выраженное ингибирование синтеза стерина при введении холестерина с желчью можно объяснить, с одной стороны, увеличением концентрации холестерина в организме вследствие уменьшения его всасывания из желудочно-кишечного тракта и, с другой—непосредственным действием желчных кислот.

Обработка оперированных крыс бромистым этидием и окситетрациклином не вызвала достоверного уменьшения скорости включения меченых

предшественников в убихинон ни в опытах *in vivo*, ни *in vitro* (см. табл. 1—3). Однако эти факты не исключают полностью ингибирующего действия использованных препаратов на синтез ферментов в митохондриях, так как их эффект мог оказаться замаскированным. При введении оперированным крысам этих веществ обнаружено уменьшение содержания убихинона в регенерирующей печени через 72 ч после операции (см. табл. 2), что, несомненно, сказывалось на расчетной величине удельной радиоактивности. Следует отметить также, что при введении бромистого этидия и окситетрациклина наблюдалась активация включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в стерины, возможно, за счет дополнительной активации начальных стадий их образования, локализованных в цитоплазме. Дополнительная активация синтеза мевалоната также будет оказывать влияние как на концентрацию убихинона в регенерирующей печени, так и на его удельную радиоактивность. Поэтому данные о достоверном снижении концентрации убихинона в регенерирующем участке печени при введении бромистого этидия и окситетрациклина можно также интерпретировать в том смысле, что синтез ферментов, участвующих в образовании полипренилфенолов и убихинона в митохондриях в процессе регенерации значительно увеличивался, а их кодирование осуществляется митохондриальной ДНК. Необходимо отметить, что максимальное включение ^{14}C -тирозина в убихинон срезами регенерирующей печени по времени совпадает с усилением включения радиоактивных аминокислот в белки митохондрий [4, 8—10]. Эта корреляция свидетельствует, что в данный период регенерации происходит формирование митохондрий с образованием всех структурных и функциональных компонентов этих органелл.

Таким образом, в первые 3 дня после субтотальной гепатэктомии в регенерирующем участке печени наблюдается активация ферментов, осуществляющих синтез убихинона и стерина путем ускоренного их образования. Активация синтеза этих ферментов происходит одновременно. В течение 1-х суток после субтотальной гепатэктомии активируется синтез ферментов, осуществляющих начальные этапы образования изопреноидных соединений [24], затем под контролем ядерных ДНК — синтез ферментов в митохондриях, осуществляющих образование полипренилфенолов и убихинона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федуров В. В. — «Успехи совр. биол.», 1976, т. 82, с. 3. — 2. Он же. — В кн.: Молекулярная биология. Вып. 16. Киев, 1977, с. 64. — 3. Olson R. E. — «Vit. a. Horm.», 1966, v. 24, p. 551. — 4. Malkin L. I. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1970, v. 67, p. 1695. — 5. Федуров В. В., Кузьменко И. В. — «Вопр. мед. химии», 1974, № 2, с. 172. — 6. Он же. — «Бюлл. экпер. биол.», 1974, № 8, с. 109. — 7. Галкин А. П. — В кн.: Молекулярная биология. Вып. 12. Киев, 1976, с. 44. — 8. De Vries H., Kroon A. M. — «Biochim. biophys. Acta», 1970, v. 204, p. 531. — 9. Kroon A. M., De Vries H. — In: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts. Amsterdam, 1971, p. 318. — 10. Idem. — In: Control of Organelle Development. New York, 1970, p. 181. — 11. Kremasky V., Kuzela S., Kobarov J. et al. — «Neoplasma (Bratisl.)», 1974, v. 21, p. 37. — 12. Krishnaiah K. V., Joshi V. C., Ramasarma T. — «Arch. Biochem.», 1967, v. 121, p. 147. — 13. Back P., Hamprich B., Lynen F. — Ibid., 1969, v. 133, p. 11. — 14. Siperstein M. D., Fagan V. M. — «J. biol. Chem.», 1966, v. 241, p. 602. — 15. Higgins G. M., Anderson R. M. — «Arch. Path.», 1931, v. 12, p. 186. — 16. McIlwain H. — «Biochem. J.», 1961, v. 78, p. 213. — 17. Gold P. H., Olson R. E. — «J. biol. Chem.», 1966, v. 241, p. 3507. — 18. Федуров В. В. — «Вопр. мед. химии», 1976, № 4, с. 472. — 19. Монцевичуте-Эрингене Е. В. — «Пат. физиол.», 1964, № 4, с. 71. — 20. Whistance G. R., Field F. E., Threlfall D. R. — «Europ. J. Biochem.», 1971, v. 18, p. 46. — 21. Trumppower B. L., Houser R. M., Olson R. E. — «J. biol. Chem.», 1974, v. 249, p. 3041. — 22. Gonzales-Cadavid N. E. — «Sud.-cellular Biochem.», 1971, v. 1, p. 1. — 23. Verbin R. S., Sullivan R. J., Farber E. — «Lab. Invest.», 1969, v. 21, p. 179. — 24. Takeuchi N., Katayama Y., Matsumiya K. et al. — «Biochim. biophys. Acta», 1976, v. 450, p. 57. — 25. Wiss O. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1976, v. 68, p. 353.

Поступила 10/IV 1977 г.

REGULATION OF THE METABOLISM OF UBIQUINONE: STUDIES IN REGENERATING RAT LIVER TISSUE

V. V. Fedurov

Central Research Laboratory, A. A. Bogomoletz Medical School, Kiev

Distinct increase in biosynthesis of ubiquinone and sterols was observed in regenerating liver tissue of rats; the rate of ubiquinone degradation was not altered. This phenomenon was characterized by incorporation of ^{14}C -tyrosine into ubiquinone and of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate into ubiquinone and sterols in vivo and in vitro. An increased turnover of enzymes, participating in synthesis of the substances, was found in cytoplasm and mitochondria of regenerating liver after administration into animals with subtotal hepatectomy of specific inhibitors: cycloheximide, ethidium bromide, hydroxytetracycline, cholesterol and cholesterol with bile; relative rates of labelled precursors incorporation into ubiquinone and sterols were then estimated in vitro. The highest rate of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into ubiquinone was found within 24 hrs after hepatectomy, into sterols — within 48 hrs and 72 hrs after hepatectomy. Mitochondrial DNA appear to code certain functional proteins responsible for synthesis of ubiquinone in mitochondria. The enzymes, which formed precursors of isoprenoid substances in cytoplasm, were shown to regulate ubiquinone biosynthesis. Regulation of ubiquinone biosynthesis in regenerating liver is discussed.

УДК 618.2-07:616.153.962.4-074

А. В. Соколов, Г. А. Козляева, Н. В. Меснянкина,
Ю. С. Татаринов

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО β_1 -ГЛОБУЛИНА

Онкологический научный центр АМН СССР, Москва, кафедра биохимии II Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова

Из сыворотки ретроплацентарной крови при помощи ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, гельфильтрации на сефадексе G-200, хроматографии на гидроксилапатите, ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и препаративного изофокусирования в амфолинах получен специфический для трофобластических опухолей антиген. В процессе выделения выявлены выраженная гетерогенность данного белка и изменение ряда его свойств с увеличением степени чистоты препарата. Получен ряд препаратов со степенью чистоты 90—95% белка, иммунологически идентичных, но различающихся по электрофоретической подвижности, изоэлектрическим точкам и некоторым другим свойствам.

Специфический β_1 -глобулин беременности [1, 2], или так называемый β_1 -г-глобулин (БГГ), привлек особое внимание после обнаружения его в сыворотке крови больных с трофобластическими опухолями [3—5]. Была установлена связь [5] между БГГ и злокачественными клетками хорионэпителиомы матки. В последнее время были получены очищенные препараты БГГ из экстракта плаценты человека и сыворотки крови беременных женщин [6, 7]. В настоящей работе описан модифицированный метод выделения и очистки БГГ из ретроплацентарной сыворотки крови.

Методы и результаты исследования

Моноспецифическая сыворотка против БГГ человека была получена от кроликов, иммунизированных фракцией β_1 -глобулинов. Схема иммунизации животных, техника приготовления моноспецифической антисыворотки и порядок идентификации БГГ были описаны нами ранее [1].

Этапы выделения и очистки БГГ показаны нами в таблице. Исходным материалом служила ретроплацентарная кровь, которая поступала к нам из различных родильных домов. К одному объему сыворотки, полученной из ретроплацентарной крови (обычно брали 500 мл сыворотки), по каплям при перемешивании добавляли 2,5 объема 0,5% раствора риванола pH 6,0 и оставляли на сутки при 4°C. Содержание БГГ в исходном материале оценивали путем титрования с последующим расчетом на 1 мг белка. Выпавший осадок удаляли центрифугированием при 3500 об/мин в течение 40 мин, а к надосадочной жидкости добавляли NaCl до получения 3% раствора. Образовавшийся осадок вновь удаляли центрифугированием, супернатант обрабатывали активированным углем. К раствору при перемешивании капельно добавляли равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония (pH 7,0). Через 18 ч полученный после центрифугирования осадок растворяли

в минимальном количестве 0,005 М трис-НСl-буфера рН 8,0 и проводили гельфильтрацию на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной тем же буфером. В результате получали 375 мл раствора белка с концентрацией около 2% и титром БГГ 1 : 64, выход составлял около 70%, удельная активность увеличивалась в 2 раза. Полученный материал вводили в колонку 6×30 см с ДЭАЭ-СС-целлюлозой (фирма «Серва»), уравновешенную 0,001 М трис-НСl-буфером рН 8,0, и после промывания колонки уравновешивающим буфером (около 1500 мл) проводили элюцию плавным градиентом NaCl в том же буфере, записывая кривую элюции с помощью проточного УФ-спектрофотометра «Увикорд-2» при длине волны 278 нм (рис. 1, А). Концентрацию хлористого натрия определяли рефрактометрически. Получаемые фракции титровали для выявления БГГ-активности со стандартной тест-системой на БГГ (чувствительность 5 мкг/мл). БГГ обнаружен в двух белковых пиках, первый из которых снимался градиентом хлористого натрия 0,05—0,07 М, второй — 0,125—0,15 М. Фракции, соответствующие каждому пику активности, объединяли, концентрировали высаливанием сернокислым аммонием 50% насыщения и диализовали. Анализ показал, что выход БГГ составил около 50% исходного количества антигена, причем 10—12% его было в первой фракции, где количество БГГ составило 2,4% общего

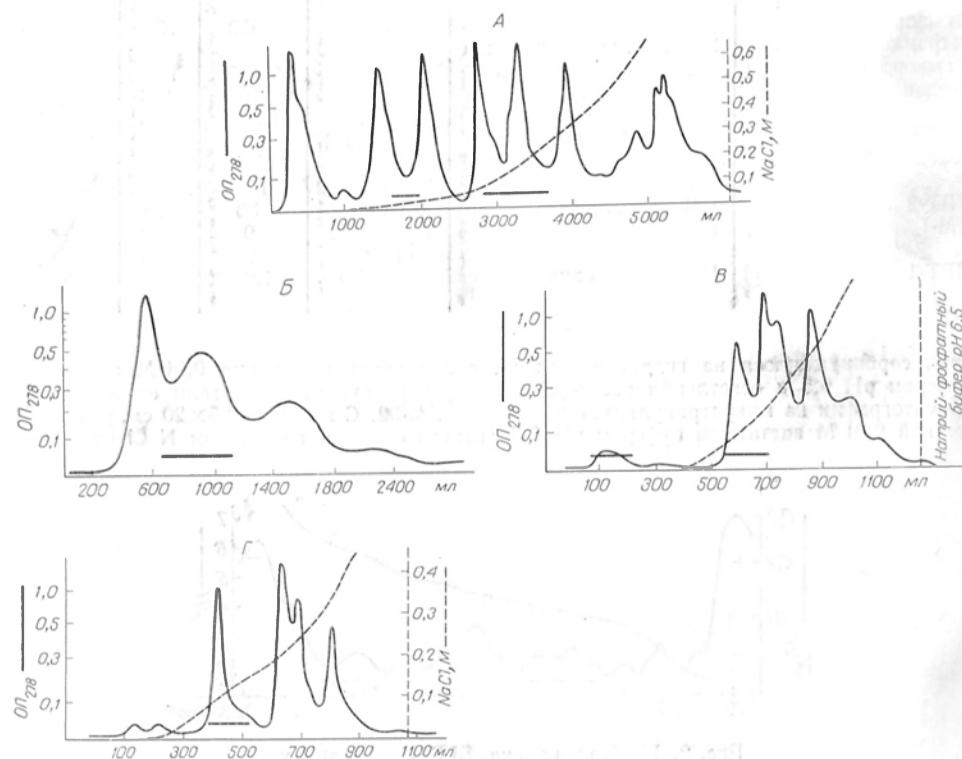


Рис. 1. Этапы выделения БГГ ретроплацентарной крови.

А — хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе; Б — гельфильтрация на сефадексе G-200; В — ионообменная хроматография на биогеле НРГ; Г — ионообменная хроматография на КМ-32-целлюлозе. Здесь и на рис. 2 фракции, содержащие БГГ, отмечены сплошной линией.

белка, а основная масса белка содержалась во втором пике, где степень чистоты была 5,3—6,8%. Анализ БГГ во фракциях показал, что антиген первого пика при иммунофорезе в агарозе движется как γ -глобулин, тогда как из второго имеет подвижность БГГ в свежей сыворотке ретроплацентарной крови. В дальнейшем использовали материал второй фракции.

Следующим этапом выделения была гельфильтрация на сефадексе G-200. Материал, уравновешенный 0,01 М фосфатным буфером рН 7,0 с 0,15 М NaCl, вводили в колонку 6×120 см с сефадексом G-200, уравновешенную тем же буфером. Результат гельфильтрации представлен на рис. 1, Б. БГГ элюировался во фракциях при соотношении $V_0/V_0 = 1,55$, что соответствует молекулярному весу около 140 000 (у стандартного вещества, альдолазы, с молекулярным весом 147 000 соотношение V_0/V_0 на данной колонке равно 1,48). Полученная фракция после высаливания сернокислым аммонием 60% насыщения имела чистоту около 18—20%.

После тщательного диализа против 0,005 М натрий-фосфатного буфера материал подвергали хроматографии на колонке с гидроксилатитом. Биогель НРТ (фирма «Биорад»), уравновешенный буфером, помещали в колонку размером 2×25 см. После промывания колонки 400—500 мл фосфатного буфера 0,005 М элюцию проводили возрастающими концентрациями данного буфера (рис. 1, В). 15—17% БГГ не сорбируется на обменнике, и получаемый препарат имеет чистоту 70—75%, но основная масса антигена снимается при концентрации фосфатного буфера 0,15 М, имея большую примесь балластных белков и чистоту 36—40%. Фракция, не сорбирующаяся на биогеле, после изоэлектрического фокусирования имела чистоту 95%, а ее изоэлектрическая точка равнялась $6,0 \pm 0,5$. Фрак-

Схема выделения и очистки БГГ

Этапы выделения и очистки БГГ			Общий белок, %	БГГ, мг	Степень чистоты, %
исходный материал	процедура	полученный материал			
Ретроплацентарная сыворотка	—	—	32 500	160	0,4—0,5
Ретроплацентарная сыворотка	Риванол, полунасыщение	Осадок	9 050	112	0,8—1,0
Осадок	сульфатом аммония	ДЭАЭ-1	400	9,6	2,4
	ДЭАЭ-целлюлоза	ДЭАЭ-2	1 240	70,6	5,3—6,8
ДЭАЭ-2	Сефадек G-200	Сефадекс-1	260	48	18—20
Сефадекс-1	Биогель НРТ	НРТ-1	4,6	3	73
		НРТ-2	110	36	36—40
НРТ-2	КМ-32-целлюлоза	КМ-1	33	19	60
КМ-1	Изофокусировка	1. рI—4,12	2,9	2,8	94
		2. рI—6,0	0,9	0,6	70
НРТ-1	Изофокусировка	3. рI—6,0	1,9	1,8	93

цию, сорбирующуюся на гидроксилатите, после уравнивания 0,01 М ацетатным буфером рН 5,5 и осветления раствора центрифугированием, подвергали ионообменной хроматографии на микрогранулярной целлюлозе КМ-32. С колонки 2,5×20 см, уравновешенной 0,01 М ацетатным буфером рН 5,5 антиген снимали градиентом NaCl от 0,1 до

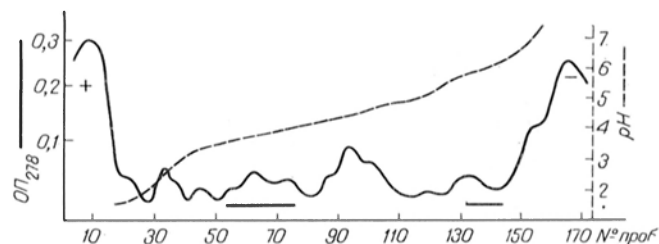


Рис. 2. Изофокусировка БГГ в амфолинах.

0,15 М (рис. 1, Г) и после высаливания сернокислым аммонием до 60% насыщения и диализа лиофилизировали. Анализ полученного препарата показал, что чистота антигена составляла 57—60%. Дальнейшей процедурой очистки антигена было препаративное электрофокусирование в амфолинах. Лيوфилизированный материал растворяли в 1% растворе глицерина на деионизированной воде. После центрифугирования при 16 000 об/мин препарат наносили на колонку ЛКБ-8120, используя амфолины рН 3,0—10,0. Время процедуры, как правило, было равно 72 ч, напряжение последние 24 ч — 800 В, сила тока — 0,9—1,0 мА. Фракции собирали по 2,5 мл, рН-метрию проводили на титраторе ТТТ_{1С} (фирма «Радиметр») при 4°C, используя комбинированный электрод ГК-265с. Преципитационная активность распределялась двумя пиками: 80—85% в пике с изоэлектрической точкой $4,12 \pm 0,1$ и 15—20% с изоэлектрической точкой $6,0 \pm 0,1$ (рис. 2). Степень чистоты первой фракции БГГ с рI 4,12 составляла 92—94%, тогда как вторая фракция содержала около 70% БГГ и при электрофорезе в акриламидном геле мигрировала в зоне γ-глобулинов. Первая фракция сохраняла электрофоретическую подвижность β-глобулинов (рис. 3).

В процессе выделения расчет производили грубо по данным спектрофотометрии, считая $E_{280}^{1\%}$ равной 10,0, а чувствительность тест-систем на БГГ равной 5 мкг/мл. Количество белка в конечных продуктах определяли по методу Лоури (см. таблицу).

Обсуждение

В процессе очистки БГГ нами использованы типичные методы выделения белков. Из нативной сыворотки БГГ высаливается в зоне от 15 до 50 % насыщения, но уже при удалении основной массы глобулинов для его количественного осаждения требуется 60 % насыщение. Риванолом из сыворотки осаждается около 10—12 % БГГ, тогда как после гelfильтрации на сефадексе G-200 БГГ осаждается целиком, но не осаждается 25 % спиртом, что может говорить о возможной связанности БГГ с γ -глобулинами в сыворотке. При аналитическом изофокусировании препаратов после обработки риванолом и полунасыщением сернокислого аммония сыворотка БГГ распределяется в широких пределах с двумя максимумами в зонах с $pH\ 4,1 \pm 0,2$ и $pH\ 6,05 \pm 0,2$, что говорит о большой гетерогенности белка, а это очень

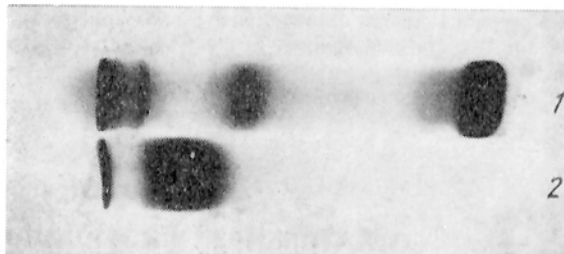


Рис. 3. Электрофорез БГГ в полиакриламидном геле. 1 — ретроплацентарная сыворотка; 2 — очищенный препарат БГГ.

затрудняет его очистку. Исходя из данных о том, что БГГ идентичен β -гликопротеиду, выделенному из экстрактов Боном [2], можно предположить, что при длительном хранении и в процессе выделения часть углеводных компонентов отщепляется и поэтому изменяется изоэлектрическая точка белка и его подвижность в электрическом поле.

В отличие от методики, используемой Боном [6] для выделения аналогичного белка из плаценты, мы не применяли зонального электрофореза и осуществляли ионообменную хроматографию на катионообменнике и препаративное изоэлектрическое фокусирование. Приводимые Боном [6] данные по гelfильтрации на сефадексе G-150 не соответствуют нашим данным, но вполне согласуются с данными Лина и соавт. [7]. Описываемая этими авторами методика выделения специфического β -глобулина, идентичного БГГ [1], также не включала катионообменной хроматографии. Однако наблюдаемые нами особенности при выделении БГГ, связанные с его гетерогенностью, были также отмечены в работе Лина и соавт. [7].

Таким образом, полученные высокоочищенные препараты БГГ отличаются по изоэлектрическим точкам ($pI\ 4,12$ и $6,0$) и поведению в электрическом поле, но обладают полной иммунохимической идентичностью. Специфический коэффициент экстинкции в УФ-свете составляет 11,5 в 0,1 М фосфатном буфере ($E_{280}^{1\%} = 11,5$). Полученные препараты могут быть использованы для разработки высокочувствительных методов определения БГГ в биологических жидкостях и изучения физико-химических и биологических свойств с учетом степени их чистоты.

Работа была частично субсидирована Всемирной организацией здравоохранения (Женева, грант № R-00556).

ЛИТЕРАТУРА

1. Татарников Ю. С., Масюкевич В. Н. — «Бюлл. exper. биол.», 1970, № 6, с. 66—68. — 2. Вонн Н. — «Arch. Gynäk.», 1971, Bd 210, S. 444—457. — 3. Татарников Ю. С., Меснянкина Н. В., Никулина Д. М. — «Акуш. и гин.», 1974, № 5, с. 67—68. — 4. Татарников Ю. С., Меснянкина Н. В., Никулина Д. М. и др. — «Бюлл. exper. биол.», 1974, № 9, с. 79—83. — 5. Татарников Ю. С., Фалалеева Л. М., Калашников В. В. — «Int. J. Cancer», 1976, v. 17, p. 626—632. — 6. Вонн Н. — «Blut», 1972, Bd 24, S. 292—303. — 7. Lin T. M., Halbert S. P., Kiefer D. et al. — «Int. Arch. Allergy», 1974, v. 47, p. 35—53.

Поступила 12/V 1977 г.

ISOLATION AND PURIFICATION OF SPECIFIC β_1 -GLOBULIN

A. V. Sokolov, G. A. Kozlyayeva, N. V. Mesnyankina, Yu. S. Tatarinov

Research Oncologic Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR,
Chair of Biochemistry, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Antigen, specific for trophoblastic tumor, was isolated from retroplacental blood by means of ion exchange chromatography on DEAE cellulose, gel filtration on Sephadex G-200, chromatography on hydroxylapatite and CM-cellulose and by preparative isofocusing using ampholines. Distinct heterogeneity of the protein and alteration in several its properties were observed as purity of the preparation was increased in course of isolation. A series of the protein preparations was obtained with 90-95% purity and with similar immunologic properties but the preparations differed in electrophoretic mobility, isoelectric points and some other patterns.

УДК 615.917'262.07:616.153.915'96

В. Н. Титов, Д. Г. Пицин

О ПАТОГЕНЕЗЕ ГИПЕРЛИПОПРОТЕИДЕМИИ У КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЭТАНОЛА

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Однократное введение этанола крысам в дозе 6 г/кг вызывает накопление триглицеридов в печени и развитие гиперлипопротеидемии. Усиливается синтез моно-, ди- и триглицеридов, повышается синтез апопротеинов липопротеидов очень низкой плотности в печени. В крови накапливаются липопротеиды очень низкой плотности, нарушается их превращение в липопротеиды низкой плотности, понижается синтез липопротеидов высокой плотности. В жировой ткани снижается синтез жирных кислот и повышается активность гормонально зависимой липопротеидлипазы. Различие потребления пулов ацетил-КоА, образованных из экзогенных ^{14}C -ацетата и ^3H -лейцина, в синтезе нейтральных липидов и фосфолипидов указывает на компартментализацию пулов ацетил-КоА в синтезе жирных кислот.

Введение этанола человеку и экспериментальным животным вызывает накопление липидов (триглицеридов) в печени и плазме крови [1—3]. Предложены различные объяснения происходящих нарушений, однако механизм их остается неясным. На протяжении последних лет обстоятельному обсуждению подвергнуты четыре механизма: усиление синтеза жирных кислот в печени в условиях накопления в цитоплазме гепатоцитов избыточного количества ацетата и НАД·Н; повышенное поступление жирных кислот в печень при усилении липолиза в жировой ткани; снижение окисления жирных кислот в митохондриях и нарушение формирования липопротеидов и их секреции в кровь [4—6]. В экспериментах на крысах при введении этанола показано усиленное поступление в печень ^{14}C -пальмитиновой кислоты, освобожденной из жировой ткани [7]. Алкоголь усиливает синтез жирных кислот в печени при использовании ^{14}C -ацетата как предшественника, индуцирует образование триглицеридов из ^{14}C -пальмитиновой кислоты [8, 9]. В цитоплазме гепатоцитов алкоголь под влиянием алкогольдегидрогеназы окисляется до ацетальдегида и далее до ацетата. Акцентором протонов служит НАД, при этом отношении НАД·Н/НАД значительно увеличивается [10]. Образующийся ацетальдегид ингибирует окисление жирных кислот в изолированных митохондриях печени и блокирует активность цикла трикарбоновых кислот [11—13]. Хроническое введение алкоголя вызывает гепатотоксический эффект, свойственный четыреххлористому углероду, нарушая синтез белковой части липопротеидов (апопротеинов) и секрецию их в кровь [10, 14].

В ранее выполненных исследованиях основное внимание было уделено синтезу жирных кислот и формированию триглицеридов при использовании в качестве предшественников ^{14}C -ацетата и меченых жирных кислот; остальным классам нейтральных липидов и фосфолипидам уделено меньше

внимания. Усиленное окисление этанола в цитоплазме гепатоцитов приводит к сдвигу окислительно-восстановительного потенциала, нарушению функции митохондрий, что может оказать влияние на метаболизм азотсодержащих компонентов, в частности, аминокислот [15].

Целью настоящего исследования является изучение влияния однократного введения этанола на синтез нейтральных липидов и фосфолипидов в печени крыс при использовании в качестве предшественников ^{14}C -ацетата и ^3H -лейцина, биосинтез белковой части липопротеидов (апопротеинов) очень низкой плотности в печени и активность гормональнозависимой липопротеидлипазы (триацилглицеролгидролазы) жировой ткани. При проведении этих исследований был использован ^3H -лейцин, потому что все 6 его углеродных атомов превращаются в ацетил-КоА. Кроме того, в процессе метаболизма лейцина образуется β -окси- β -метилглутарил-КоА, промежуточный продукт синтеза холестерина.

Методика

Работа выполнена на 50 крысах-самцах линии Вистар весом 180—220 г. Поставлены 2 серии опытов. В каждой серии 10 подопытных животных, голодавших в течение 14 ч, однократно через зонд вводили этанол из расчета 6 г на 1 кг веса тела в виде 50% водного раствора; контрольные животные получали равный объем изотонического раствора. Животных декапитировали через 16 ч после начала опыта. За 2 ч до декапитации крысам внутривенно вводили $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат и $3,4\text{-}^3\text{H}$ -лейцин по 10 мкКи на 100 г веса тела. Собирали кровь, кусочки печени и жировой ткани и промывали их охлажденным изотоническим раствором, высушивали фильтровальной бумагой, навески гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. Получали общий липидный экстракт и очищали его по методу Фолч и соавт. [16]. Липиды из жировой ткани экстрагировали 50-кратным объемом хлороформа, растворитель упаривали, количество липидов определяли гравиметрически. Препаративное разделение отдельных классов нейтральных липидов выполнено на тонком слое силикагеля на пластинах 20×25 см при толщине слоя 0,7—0,8 мм. Применяли одну и ту же двухступенчатую хроматографию в системе эфир — бензол — этанол — уксусная кислота (40 : 50 : 2 : 0,2) и гексан — эфир (94 : 6) [17]. Липидные пятна проявляли парами йода [18]. Зоны нейтральных липидов последовательно элюировали этиловым эфиром и смесью хлороформ — метанол (4 : 1). Фосфолипиды извлекали смесью хлороформ — метанол (2 : 1) и повторно смесь хлороформ — метанол — вода (3 : 5 : 2). Из полученного экстракта в аликвоте, содержащей 20—100 мкг липида, определяли их концентрацию фосфорно-ванилиновым методом [19]. Для определения радиоактивности липидов элюаты упаривали досуха в сцинтилляционных кюветах, активность по ^{14}C и ^3H определяли на жидкостном сцинтилляционном спектрометре фирмы «Нуклеар Чикаго» с использованием внешнего стандарта.

Для получения липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) из печени крыс ткань гомогенизировали в 10-кратном объеме буфера с плотностью 1,006 г/мл с последующим центрифугированием на ультрацентрифуге Л-5-65 (Бекман, США), ротор 40, скорость 40 000 об/мин, температура 15°C , время 18 ч. ЛПОНП, липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) и липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) выделены из сыворотки крови последовательным ультрацентрифугированием при плотности буфера 1,006, 1,063 и 1,210 г/мл на этой же ультрацентрифуге при использовании ротора Ти-65 [20]. Выделенные липопротеиды речентрифугировали при этой же плотности буфера. Для получения апопротеинов выделенные липопротеиды делипидировали охлажденной смесью этанол — этиловый эфир (1 : 3). Преципитированные апопротеины отмывали 5% трихлоруксусной кислотой, содержащей меченый лейцин в концентрации 1 мкг/мл, после чего выделяли методом ультрафильтрации. Белок растворяли в 0,1 н. NaOH, количество белка определяли по методу Лоури [21]. Пробы белка переносили в кюветы и просчитывали на сцинтилляционном спектрометре после добавления тритизола [22]. Активность гормональнозависимой липопротеидлипазы жировой ткани определена методом расщепления глицерол $1\text{-}^{14}\text{C}$ -триолеата [23]. Активность липопротеидлипазы выражали в микроединицах (мкед) (нмоль образованных жирных кислот) на 1 мг жировой ткани в минуту. Удельная активность отдельных классов липидов и белка приведена в импульсах в минуту на 1 мг белка или липида. Меченые соединения получены от фирмы «Амершам», большинство реактивов — фирмы «Сигма», США. Результаты обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты

Данные о концентрации липидов в печени и сыворотке крови после однократного введения этанола представлены в табл. 1. В ткани печени достоверно увеличивается содержание триглицеридов, в меньшей степени —

Т а б л и ц а 1

Содержание липидов в печени и сыворотке крови (в мг на 100 г веса печени или 100 мл крови) крыс в контрольной группе и при введении этанола

Объект исследования	Группа животных	Фосфолипиды	Триглицериды	Свободный холестерин	Эфиры холестерина	Свободные жирные кислоты	Диглицериды	Моноглицериды	Общие липиды
Печень	Контрольная ($n=20$)	1456 ± 21	556 ± 18	272 ± 9	176 ± 2	96 ± 5	78 ± 6	42 ± 2	2616
	Опытная ($n=20$) P	1493 ± 14	1002 ± 28 $<0,01$	235 ± 9	110 ± 2	112 ± 7	76 ± 13	51 ± 2 $<0,05$	3079
Сыворотка крови	Контрольная	85 ± 3	32 ± 1	23 ± 1	69 ± 2	19 ± 1	—	—	228
	Опытная P	101 ± 4	62 ± 1 $<0,01$	23 ± 2	82 ± 4 $<0,05$	32 ± 2 $<0,05$	—	—	300

Т а б л и ц а 2

Включение ^{14}C -ацетата и ^3H -лейцина (в имп/мин на 1 мг белка) в апопротеины печени и сыворотки крови крыс в контроле и при введении этанола

Группа животных	ЛПОНП печени		ЛПОНП сыворотки крови		ЛПНП сыворотки крови		ЛПВП сыворотки крови	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
Контрольная ($n=20$)	3163 ± 150	582 ± 47	6621 ± 108	808 ± 53	6808 ± 85	493 ± 42	6242 ± 113	433 ± 68
Опытная ($n=20$) P	4032 ± 132 $<0,05$	675 ± 49	9285 ± 134 $<0,01$	2347 ± 65	5152 ± 91 $<0,05$	409 ± 34	3647 ± 98 $<0,05$	260 ± 41

свободных жирных кислот. Такие же изменения отмечены и в сыворотке крови. Накопление триглицеридов в печени может быть следствием усиленного синтеза или замедленного выведения в кровь в форме ЛПОНП. Поэтому мы исследовали синтез всех классов липидов, входящих в состав ЛПОНП (рис. 1). После однократного введения этанола синтез моно-, ди- и триглицеридов повышается в $1\frac{1}{2}$ —2 раза, в меньшей степени усилен син-

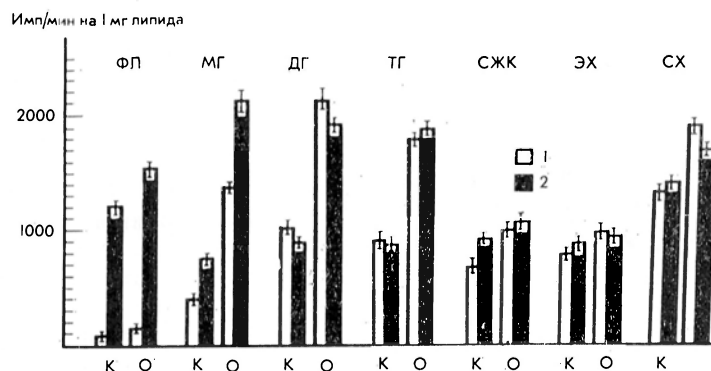


Рис. 1. Влияние этанола на включение ^{14}C -ацетата и ^3H -лейцина в липиды печени крыс (в имп/мин на 1 мг липида).

Здесь и на рис. 2: К — контроль; О — опыт; 1 — включение ^{14}C ; 2 — ^3H ; ФЛ — фосфолипиды; МГ — моноглицериды; ДГ — диглицериды; ТГ — триглицериды; СЖК — свободные жирные кислоты; ЭХ — эфиры холестерина; СХ — свободный холестерин.

тез свободного холестерина. Изменений синтеза фосфолипидов и эфиров холестерина не отмечено. Данные о радиоактивности отдельных классов липидов в сыворотке крови представлены на рис. 2. В сыворотке крови воз-

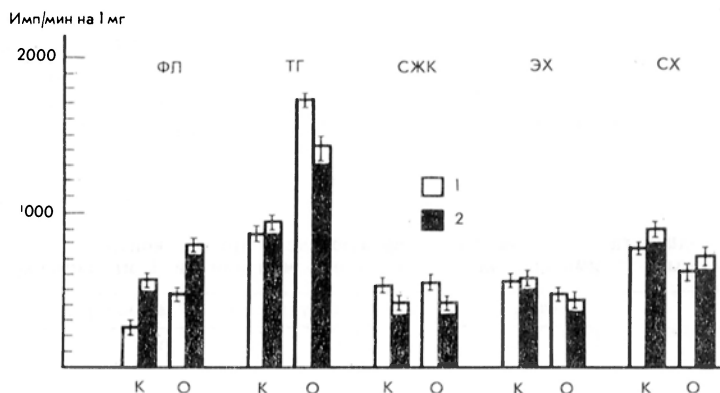


Рис. 2. Влияние этанола на включение ^{14}C -ацетата и ^3H -лейцина в липиды сыворотки крови (в имп/мин на 1 мг липида).

растает активность триглицеридов и фосфолипидов, моно- и диглицериды не определяются. Повышения удельной радиоактивности свободного холестерина, эфиров холестерина и свободных жирных кислот не отмечено. Данные указывают, что в течение эксперимента вновь синтезированные триглицериды поступают в кровь.

Мы исследовали синтез не только липидов ЛПОНП, но и белковой части — апопротеинов ЛПОНП (апо-ЛПОНП), играющих важную роль в процессе формирования, секреции и метаболизма ЛПОНП [24]. Полученные результаты представлены в табл. 2. При синтезе апопротеинов используется преимущественно пул аминокислот (^3H -лейцин). В условиях введе-

ния алкоголя достоверно повышается синтез апо-ЛПОНП, отношение меток в белке остается прежним. При изучении апопротеинов отдельных классов липопротеидов в сыворотке крови отмечено повышение удельной радиоактивности апо-ЛПОНП, снижение включения метки в апо-ЛПНП и уменьшение удельной радиоактивности апо-ЛПВП.

Для выяснения различий в использовании для синтеза липидов в печени пулов ацетил-КоА, образованного из ацетата и сформированного из эндогенных аминокислот и лейцина, мы рассчитали отношение $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ для каж-

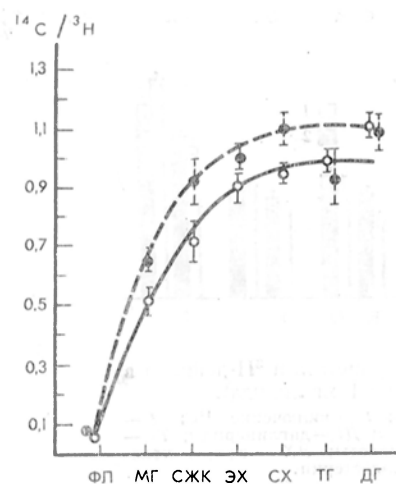


Рис. 3. Сопоставление отношения $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ в липидах печени крыс в контроле и после введения этанола. Светлые кружки — контроль, темные — опыт. Остальные обозначения, как на рис. 1 и 2.

дого класса липидов. Полученные результаты представлены в графическом изображении на рис. 3. В триглицеридах и свободном холестерине это отношение близко к единице, из чего следует, что оба пула ацетил-КоА включаются в синтез липидов в равной степени. В фосфолипидах это отношение значительно ниже, чем во всех классах нейтральных липидов. Отношение $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ меняется и в классе моноглицеридов, занимая промежуточное положение между фосфолипидами и триглицеридами. Приведенные данные указывают на различие в использовании пулов ацетил-КоА при синтезе отдельных классов липидов. Характер представленных кривых указывает на усиленное под влиянием этанола потребление ацетил-КоА, образованного из ацетата, для синтеза нейтральных липидов.

В дальнейшем исследовании нами изучена активность гормонально зависимой липопротеидлипазы (триацилгли-

церолгидролазы) эпидидимальной жировой ткани. У контрольных животных активность липопротеидлипазы жировой ткани составляет $0,30 \pm 0,02$ мкед, после введения этанола она повышается до $2,27 \pm 0,11$ мкед ($P < 0,01$).

Таблица 3

Включение ^{14}C -ацетата и ^3H -лейцина в жировую ткань крыс в контроле и при введении этанола (в имп/мин на 1 г ткани и в имп/мин на 1 мг липидов)

Группа животных	Включение на 1 г жировой ткани		Удельная радиоактивность	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
Контрольная (n=22)	$22\,486 \pm 952$	$18\,960 \pm 816$	$24,7 \pm 1,0$	$20,2 \pm 0,7$
Опытная (n=22) P	$15\,438 \pm 683$ $<0,01$	$14\,086 \pm 1102$ $<0,01$	$18,0 \pm 0,9$ $<0,05$	$14,4 \pm 1,3$ $<0,05$

Поскольку синтез жирных кислот в жировой ткани крыс происходит более интенсивно, чем у человека, мы оценили роль жировой ткани в синтезе жирных кислот de novo и возможное участие их в развитии гиперлипидемии. Полученные данные представлены в табл. 3. Введение этанола обуславливает снижение синтеза жирных кислот в эпидидимальной жировой ткани крыс. Это согласуется с данными об активации липолиза в жировой ткани и усиленном поступлении жирных кислот в кровеносное русло.

Рассматривая на основании полученных данных патогенетические механизмы накопления триглицеридов в печени и развитие гипертриглицеридемии, можно отметить следующее. Этанол приводит к усиленному синтезу жирных кислот *de novo* из экзогенного и эндогенного ацетата, а также из эндогенного ^3H -ацетил-КоА и усиливает их этерификацию с образованием триглицеридов [25, 26]. После однократного введения этанола в эндоплазматическом ретикулуме повышается активность ферментных систем, в частности глицерофосфатацилтрансферазы, что приводит к усилению этерификации жирных кислот [27]. В этом процессе участвуют жирные кислоты, как синтезированные *de novo*, так и освобожденные из жировой ткани в процессе гидролиза триглицеридов [7]. Мнения исследователей о включении в синтез триглицеридов этих пулов жирных кислот противоречивы. Показано, что накопление триглицеридов в печени прямо пропорционально дозе введенного этанола и образованного из него пула ацетил-КоА [28]. В то же время показано повышение синтеза жирных кислот из меченой пировиноградной кислоты и ацетата в перфузируемой печени после однократного введения этанола [30]. Следовательно, отмеченное нами усиление синтеза триглицеридов в печени после однократного введения этанола происходит путем этерификации жирных кислот, синтезированных в печени и поступивших из жировой ткани.

После однократного введения этанола повышается активность липопротеидлипазы жировой ткани. Полученные данные согласуются с результатами по мобилизации ^{14}C -пальмитата из эпидидимальной жировой ткани крыс [7, 31]. Усиленное поступление свободных жирных кислот из жировой ткани подтверждается также данными об идентичности жирнокислотного состава триглицеридов жировой ткани и печени при введении этанола [32]. Возможно, что в печени накапливаются жирные кислоты, синтезированные в других органах, в частности в жировой ткани. Однако нами показано снижение синтеза жирных кислот в жировой ткани после введения этанола. Одновременно нельзя исключить усиления синтеза жирных кислот в стенке тонкой кишки [33]. Снижение липолитической активности жировой ткани при использовании больших доз никотиновой кислоты, одновременно с введением этанола, не ослабляет, а даже усиливает жировую инфильтрацию печени, приводя к нарушению формирования ЛПОНП в печени и их секрции в кровь [34].

Введение этанола экспериментальным животным обуславливает усиление формирования ЛПОНП в печени. Это заключение сделано на основании данных о повышении удельной радиоактивности специфического белка апо-ЛПОНП одновременно с усилением синтеза триглицеридов. Это свидетельствует о дифференцированном влиянии этанола на синтез отдельных белков в печени. Введение этанола *in vivo* и добавление его в перфузат печени вызывают быстрое снижение синтеза альбумина [35]. В изолированных микросомах и митохондриях печени однократное введение этанола ингибирует синтез белка [36, 37]. Противоречивы сведения о секрети сформированных липопротеидов в кровь. Повышение удельной радиоактивности апо-ЛПОНП в печени и сыворотке крови крыс указывает на выход вновь синтезированных липопротеидов в кровь. Секретия липопротеидов в кровь снижается через 2 ч после введения этанола и повышается через 8 ч [28]. Эксперименты с использованием тритона WR-1359 показали, что нарастание гипертриглицеридемии после введения этанола зависит от поступления липидов из печени [6]. Однако можно полагать, что при длительном введении этанола процесс выхода в кровь вновь синтезированных ЛПОНП может быть нарушен.

ЛПНП образуются в плазме крови в процессе метаболического превращения ЛПОНП под влиянием гепаринзависимой липопротеидлипазы. Снижение удельной радиоактивности апо-ЛПНП указывает на нарушение пре-

вращения ЛПОНП в ЛПНП, что может быть одним из моментов развития гиперлипопротеидемии. Это нарушение, по нашему мнению, является следствием снижения активности гепаринзависимой липопротеидлипазы плазмы крови. Такое заключение сделано на основании данных о нарушении превращения ЛПОНП в ЛПНП, повышении концентрации свободных жирных кислот в сыворотке крови, повышении активности гормональнозависимой липопротеидлипазы жировой ткани, находящейся в реципрокных взаимоотношениях с липопротеидлипазой сыворотки, и данных литературы о снижении синтеза альбумина в печени. При длительном введении этанола эти нарушения могут обуславливать развитие гиперлипопротеидемии и у человека [38]. В клинике у большинства алкоголиков отмечен IV тип гиперлипопротеидемии по классификации Фредриксона. При введении добровольцам 180 мл виски в день отмечено развитие гипертриглицеридемии, на электрофореграмме выявлена промежуточная фракция липопротеидов, что указывает на нарушение метаболического превращения ЛПОНП в ЛПНП [39]. Снижение удельной радиоактивности апо-ЛПВП может быть следствием замедления его синтеза в печени. Возможно, это отчасти связано с нарушением метаболизма ЛПОНП и поступления апо-ЛПОНП (апопротеина С) в ЛПВП.

Изменения, возникающие в организме после введения этанола, могут быть купированы введением специфического ингибитора алкогольдегидрогеназы — пиразола и применением β -адреноблокаторов [40]. Это указывает на роль симпатико-адреналовой системы в патогенезе нарушений после введения этанола. Повышением концентрации катехоламинов можно объяснить повышение активности гормональнозависимой липопротеидлипазы жировой ткани и ингибирование гепаринзависимой липопротеидлипазы сыворотки крови [41]. С эффектом катехоламинов связано также повышение уровня циклического АМФ в печени с максимумом через 16 ч после введения этанола [42].

Таким образом, гиперлипопротеидемия после однократного введения этанола развивается в результате усиленного синтеза липидов (триглицеридов) в печени, синтеза апо-ЛПОНП, усиленной секреции ЛПОНП в кровеносное русло, нарушения превращения ЛПОНП в ЛПНП.

Полученные данные показали, что два пула ацетил-КоА — ^{14}C -ацетил-КоА, образованный из экзогенно введенного ацетата, и ^3H -ацетил-КоА, образованный в процессе метаболизма ^3H -лейцина, в одинаковой степени участвуют в синтезе всех классов нейтральных липидов. В синтезе фосфолипидов используется преимущественно ^3H -ацетил-КоА. Этот факт не зависит от этанола, так как отношение $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ в фосфолипидах одинаково как в контроле, так и в опыте. Сопоставляя структуру и пути синтеза фосфолипидов и триглицеридов, можно полагать, что различие касается синтеза жирных кислот. В фосфолипидах по сравнению с триглицеридами преобладают жирные кислоты с большим числом углеродных атомов и более ненасыщенные. Возможно, это различие объясняется неодинаковым участием двух пулов ацетил-КоА в синтезе жирных кислот *de novo* или элонгации жирных кислот [43, 44]. Однако во втором случае отношение $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ было бы более высоким. Это подтверждается исследованиями, в которых отмечено снижение активности ферментных систем элонгации и десатурации жирных кислот [45]. Можно полагать, что в синтезе длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот *de novo* и в процессе их элонгации и десатурации в микросомах и митохондриях используется преимущественно пул ацетил-КоА, образованный, в частности, из аминокислот. Полученные данные указывают на компартиментализацию пулов ацетил-КоА, принимающих участие в синтезе насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. В единичных исследованиях, посвященных этому вопросу, отмечено различие в использовании пулов ацетил-КоА в печени [46]. Ацетил-КоА, образованный из ^{14}C -пирувиноградной кислоты, быстрее включается в синтез длинноцепочечных жирных кислот, чем ацетил-КоА, образованный из ацетата [47]. Эти дан-

ные согласуются с полученными нами результатами. Однако необходимо дальнейшее изучение этого вопроса, по которому имеется крайне ограниченное число работ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baroana E., Pirola R., Lieber C. S. — *J. Clin. Invest.*, 1973, v. 52, p. 296—303. — 2. Williams A., Cooper C. — *Biochem. Pharmacol.*, 1974, v. 23, p. 2063—2068. — 3. Nair C. R., Nirankari O. P., Chuttain P. N. et al. — *Clin. Sci.*, 1975, v. 48, p. 453—455. — 4. Nordmann R. G., Giudicelli V., Beaube F. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 326, p. 1—11. — 5. Ontko J. A. — *J. Lipid Res.*, 1973, v. 14, p. 78—86. — 6. Abrams M. A., Cooper C. — *Biochem. J.*, 1976, v. 156, p. 33—46. — 7. Kessler J. J. — In: *The Liver. Quantitative Aspects of Structure and Function*. Basel, 1973, p. 276—286. — 8. Blomstrang R., Kager L. — *Life Sci.*, 1973, v. 13, p. 113—123. — 9. Blomstrang R., Kagen L., Lanto O. — *Ibid.*, p. 1131—1141. — 10. Lieber Ch. S. — *Lipids*, 1968, v. 9, p. 103—115. — 11. Cederbaum A., Lieber Ch. S., Beattie D. S. et al. — *J. biol. Chem.*, 1975, v. 250, p. 5121—5129. — 12. Cederbaum A., Lieber Ch. S., Rubin E. — *Arch. Biochem.*, 1975, v. 169, p. 19—41. — 13. Lindros K. O., Vihma R., Forgochder O. A. — *Biochem. J.*, 1972, v. 126, p. 945—952. — 14. Ugarte G. — *Front. gastrointest. Res.*, 1976, v. 2, p. 150—193. — 15. Hakkinen H. M., Kulonen E. — *Biochem. Pharmacol.*, 1975, v. 24, p. 199—204. — 16. Folch J., Lees M., Stoane-Stanley G. H. — *J. biol. Chem.*, 1957, v. 226, p. 497. — 17. Freeman C. P., West D. — *J. Lipid Res.*, 1966, v. 7, p. 324—327. — 18. Barret G. C. — *Nature*, 1962, v. 194, p. 1171. — 19. Tapscott E. — *J. Chromatogr.*, 1975, v. 107, p. 420. — 20. Lindgren F. T. — In: *Analysis of Lipids and Lipoproteins*. Ed. by Percins E. G., Illions, 1975, p. 204. — 21. Lowry H. O., Rosebrough N. J., Faar L. A. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265. — 22. Fricke U. — *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 63, p. 555—558. — 23. Nilsson-Ehle P., Torhqvist H., Belfrage P. — *Clin. chim. Acta*, 1972, v. 42, p. 387—390. — 24. Nestruck A. Ch., Rubinstein D. — *Canad. J. Biochem.*, 1976, v. 54, p. 617—628. — 25. Guynn R. W., Veliso D., Harris R. L. et al. — *Biochem. J.*, 1973, v. 136, p. 639—647. — 26. Johnson O. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1974, v. 33, p. 207. — 27. Olivercrona T., Hernell O., Jonson O. et al. — *Quart. J. Stud. Alcohol.*, 1972, v. 33, p. 1—13. — 28. Estler C. J. — *Biochem. Pharmacol.*, 1975, v. 24, p. 1871—1873. — 29. Gordon E. R. — *Ibid.*, 1972, v. 21, p. 2991—3001. — 30. Johnson O., Hernell O., Olivercrona T. — *Lipids*, 1975, v. 10, p. 765—769. — 31. Johnson O., Hernell O. — *Nutr. a. Metab.*, 1975, v. 19, No 12, p. 41—44. — 32. Brodie B. B., Butler W. M., Hirning M. G. et al. — *Am. J. Clin. Nutr.*, 1961, v. 14, p. 432—435. — 33. Mistilis S. P., Ockener R. K. — *J. Lab. clin. Med.*, 1972, v. 80, p. 34—46. — 34. Sorrell M. F., Baker H., Tuma D. J. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 450, p. 231—238. — 35. Rothschild M. A., Schreiber S. S., Oratz M. — *Advanc. exp. Med. Biol.*, 1975, v. 56, p. 179—194. — 36. Burke J. P., Tumbleson M. E., Hicklin K. N. et al. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1975, v. 148, p. 1051—1056. — 37. Renis M., Giovine A., Bertolino A. — *Life Sci.*, 1975, v. 16, p. 1447—1457. — 38. Kuo P. T. — *Med. Clin. N. Amer.*, 1974, v. 58, p. 352. — 39. Avogaro P., Cazzoloto G. — *Metabolism*, 1975, v. 24, p. 1231—1242. — 40. Estler C. J. — *Res. Eup. Med.*, 1974, v. 163, p. 95—100. — 41. Kalant H., Khenna J. M., Seymour F. et al. — *Biochem. Pharmacol.*, 1975, v. 24, p. 432—434. — 42. Jauonen V. P., Savolainen M. J., Hassinen J. I. — *Ibid.*, p. 1879—1883. — 43. Enoch H. G., Catala A., Strittmatter P. H. — *J. biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 5095—5103. — 44. Seibert W. — In: *Comparative Biochemistry and Physiology of transport*. ed. by Bilich L. Amsterdam, 1974, p. 245—266. — 45. Muceli J. N., Ferrell W. J. — *Lipids*, 1973, v. 8, p. 722—727. — 46. Cederbaum A. J., Rubin E. — *Arch. Biochem.*, 1975, v. 166, p. 618—628. — 47. Fritz J. B. — In: *Gran F. (Ed.) Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism*. New York, 1968, p. 39.

Получена 12/V 1977 г.

ON PATHOGENESIS OF HYPERLIPOPROTEINEMIA IN RATS AFTER ADMINISTRATION OF ETHANOL

V. N. Titov, D. G. Pitzin

All-Union Cardiology Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Single administration of ethanol at a dose of 6 g/kg of body weight caused accumulation of triglycerides in rat liver and development of hyperlipoproteinemia. Synthesis of mono-, di-, triglycerides and apoproteins of lipoproteins of very low density was increased in liver tissue. Lipoproteins of very low density were accumulated in blood; their transformation to lipoproteins of low density was impaired and synthesis of high density lipoproteins was

decreased. In fatty tissue synthesis of fatty acids was decreased with simultaneous increase in activity of hormone-dependent lipoprotein lipase. Utilization of acetyl CoA pools, formed from exogenous ^{14}C -acetate and ^3H -leucine, was dissimilar in synthesis of neutral lipids and phospholipids; the phenomenon demonstrated that acetyl CoA pools were compartmentalized in synthesis of fatty acids.

УДК 576.851.48.098.31:577.152.153.042.2

И. И. Никольская, Н. Г. Лопатина, В. Н. Рекунова,
А. М. Юркевич, С. С. Дебов

О ВЛИЯНИИ S-НУКЛЕОЗИЛ-L-ГОМОЦИСТЕИНОВ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ МЕТИЛАЗ ДНК

Лаборатория энзимологии АМН СССР, Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Исследовано действие S-аденозил-, S-инозил-, S-уридил- и S-цитидил-L-гомоцистеинов на активность бактериальных метилаз аденина и цитозина из клеток E. coli СК и метилазы гуанина, специфической для фага ДДVI. Показано, что S-аденозил-L-гомоцистеин является мощным ингибитором реакции метилирования и в количестве 10 мкмоль подавляет активность всех исследуемых ферментов на 98—99%. При использовании суммарных ферментных препаратов не удается обнаружить разницы в сродстве S-инозил-, S-уридил- и S-цитидил-L-гомоцистеинов к различным изученным ДНК-метилазам. Все перечисленные препараты ингибируют активность метилаз ДНК в равной степени на 55—65%. Увеличение количества ингибитора до 20 мкмоль не усиливает ингибиторного эффекта. Влияние S-нуклеозил-L-гомоцистеинов не зависит от вида акцепторной ДНК.

Пострепликационное метилирование является одной из главных реакций, лежащих в основе модификации и процессинга нуклеиновых кислот, что объясняет повышенный интерес к ферментам метилирования. Наибольшее внимание исследователей, изучавших механизмы реакции метилирования, ее кинетику и действие ингибиторов до сих пор было уделено тРНК-метилазам [1—7]. Из исследований, посвященных изучению механизма действия и влиянию ингибиторов на ДНК-метилазы прокариотов, помимо ранних работ Голда и Гурвитца [8] с метилазами ДНК из E. coli, можно упомянуть лишь об экспериментах Лаутенбергера и Линна [9], выполненных на очищенных до гомогенного состояния препаратах фермента метилирования из клеток E. coli В. В настоящей работе сообщается о влиянии некоторых S-нуклеозил-L-гомоцистеинов на активность ДНК-метилаз E. coli СК, E. coli В и фермента метилирования ДНК, специфичного для фага ДДVI.

Методика

В работе использовали донор метильных групп S-аденозил-L-метионин- H^3 (SAM- H^3) фирмы «Amersham» (Англия) с удельной радиоактивностью 8,4 Ки/ммоль. ДНК тимуса — коммерческий препарат фирмы «Calbiochem» (США). S-аденозил-L-гомоцистеин (S-ADO-Hcy), S-инозил-L-гомоцистеин (S-Ino-Hcy), S-уридил-L-гомоцистеин (S-Urd-Hcy) и S-цитидил-L-гомоцистеин (S-Gyd-Hcy) синтезированы Рекуновой и соавт. [10]. Бактериофаг $\Phi_{\text{Д}}$ выращивали, как описано ранее [11]. ДНК фага $\Phi_{\text{Д}}$ выделяли фенольным методом [12]. Клетки E. coli СК выращивали по описанной ранее схеме [13]. Клетки E. coli В, зараженные фагом ДДVI, получали по отработанной ранее методике [14]. Грубый клеточный экстракт (ГКЭ) получали при разрушении клеток на ультразвуковом дезинтеграторе MSE и последующем центрифугировании при 105 000 g в течение 90 мин. Надосадочная жидкость служила ферментным препаратом. В ряде опытов ГКЭ клеток E. coli СК подвергали последовательной обработке стрептомицин сульфатом и сульфатом аммония 0,6 насыщения и фракционировали на ДЭАЭ-целлюлозе, как описано нами ранее [15]. В этих случаях была использована метилирующая фракция после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (ДЭАЭ-фр).

Метилирующую активность определяли в стандартной инкубационной смеси [16] в присутствии 2 мКи SAM- H^3 и 10 мкмоль S-Ado-Hcy и 10 или 20 мкмоль S-Ino-Hcy, S-Urd-Hcy и S-Gyd-Hcy. Помимо стандартного контроля, не содержащего акцепторной ДНК, вводили контроль, не содержащий ингибитора. Продукты метилирования определяли после хроматографии хлорнокислого гидролизата 500 мкг акцепторной ДНК в системе растворителей и-бутанол — вода — аммиак (60 : 10 : 0,1) по локализации радиоактивности на хроматограмме.

Результаты и обсуждение

В задачу проведенной работы входило изучение влияния 4 S-нуклеозил-L-гомоцистеинов на ферменты метилирования ДНК прокариотов. В работе исследовали метилазы ДНК, отличающиеся между собой как по принадлежности к типу специфичности в отношении хозяина, так и по специфичности к метилируемому основанию. В качестве ферментных препаратов использовали ГКЭ *E. coli* СК, содержащий метилазы аденина и цитозина [17] и суммарную метилирующую фракцию этого же экстракта после очистки на ДЭАЭ-целлюлозе, и грубый экстракт клеток *E. coli* В, зараженных фагом ДДVI. Эта система содержит клеточную метилазу аденина [9] и фagosпецифическую метилазу гуанина [14].

Влияние различных S-нуклеозил-L-гомоцистеинов на активность ДНК-метилаз

Характеристика фермента			Ингибирование (в %) по отношению к радиоактивности контрольной пробы * в присутствии различных количеств ингибиторов, мкмоль						
тип специфичности	метилируемое основание	препарат	S-Ado-Hcy	S-Ino-Hcy		S-Urd-Hcy		S-Cyd-Hcy	
			10	10	20	10	20	10	20
СК	Аденин	ГКЭ **	98	57	56	62	64	65	61
СК	»	ДЭАЭ-фр***	97	59	61	59	57	62	58
СК	Цитозин	ГКЭ	99	63	62	65	65	56	59
СК	Цитезин	ДЭАЭ-фр	98	56	64	54	57	60	64
В	Аденин	ГКЭ	99	64	60	64	61	63	60
ДДVI	Гуанин	ГКЭ	97	61	58	54	55	57	55

Примечание. Инкубационная смесь (0,5 мл) содержала суммарный ферментный препарат метилаз аденина и цитозина СК-специфичности или метилаз аденина и гуанина В-ДДVI-специфичности (2—4 мг белка), 100 мкг акцепторной ДНК тимуса или фага ϕ_{d1} , 2 мКи $SAM-H^3$ и соответствующее количество S-нуклеозил-L-гомоцистеина; чтобы дифференцировать степень ингибирования каждого из ферментов, хлорнокислый гидролизат 500 мкг акцепторной ДНК хроматографировали в растворителе н-бутанол — вода — аммиак (60 : 10 : 0,1) и определяли локализацию радиоактивности на хроматограмме при последующем элюировании. Одна звездочка — контрольная проба не содержала ингибиторов, две звездочки — суммарный ферментный препарат после центрифугирования при 105 000 г, три звездочки — грубый экстракт после фракционирования сульфатом аммония и очистки на ДЭАЭ-целлюлозе.

Поскольку во всех случаях ферментный препарат содержал смесь двух различных метилаз ДНК, влияние S-нуклеозил-L-гомоцистеинов на каждый из ферментов определяли дифференцированно по радиоактивности продуктов реакции, разделенных с помощью бумажной хроматографии. Результаты приведены в таблице. Представлены средние 3—4 независимых экспериментов. Отклонение от среднего значения составляет 1,5—2 %.

Обсуждая приведенные данные, следует отметить, что при использовании в качестве субстрата как ДНК тимуса, так и ДНК фага ϕ_{d1} были получены одинаковые результаты. Из этого следует, что ингибиторное действие S-нуклеозил-L-гомоцистеинов, по-видимому, не зависит от свойств акцепторной ДНК.

Исходя из данных таблицы очевидно, что S-Ado-Hcy является мощным ингибитором всех исследованных метилаз ДНК. Во всех экспериментах мы наблюдали практически полное подавление ферментативной активности. Ингибиторное действие S-Ado-Hcy объясняется, вероятно, большим сродством к ДНК-метилазам и не зависит от специфичности фермента к азотистому основанию: ДНК-метилазы специфичны в отношении цитозина; аденина и гуанина, полностью ингибируются S-Ado-Hcy. В противоположность этим данным Гильдесхайм и соавт. [4], Венкстерн и соавт. [6], Глик и соавт. [7] отмечают различия в сродстве S-Ado-Hcy к различным тРНК-

метилазам. Поскольку каждая из ДНК-метиلاзных активностей представлена индивидуальным ферментом, то не вызывает сомнений, что все изученные ДНК-метилазы бактериального и вирусного происхождения обладают общей чувствительностью к S-Ado-Hcy.

Приведенные выше результаты, равно как и данные Гурвитца [8] об ингибирующем действии S-Ado-Hcy, получены либо на ГКЭ, либо на частично очищенных препаратах. В то же время, по сообщению Лаутенберге-ра и Линна [9], очистка метилазы аденина *E. coli* В до гомогенного состояния определила потерю чувствительности фермента к действию этого ингибитора. В наших экспериментах частичная очистка ДНК-метилазы *E. coli* СК не снижает ингибирующего действия S-Ado-Hcy по сравнению с ГКЭ.

Что касается ингибиторной активности структурных аналогов S-Ado-Hcy, то следует отметить, что S-Inp-Hcy, S-Urd-Hcy и S-Cyd-Hcy одинаково ингибируют все использованные нами метилазы ДНК как бактериального, так и вирусного происхождения. Увеличение количества ингибитора в пробе с 10 до 20 мкмоль не усиливает ингибирующего эффекта. Во всех случаях действие ферментов подавляется на 55—65 %. Однако наши данные еще не позволяют сделать вывод о равной степени родства S-Inp-Hcy, S-Urd-Hcy и S-Cyd-Hcy к исследуемым ферментам. Присутствие в инкубационной смеси как минимум 2 метилаз ДНК при недостаточной степени очистки фермента может усреднить полученные результаты и симулировать равный ингибиторный эффект. В то же время не вызывает сомнения сам факт, что каждый из исследованных аналогов S-Ado-Hcy является ингибитором метилаз ДНК. Несомненно также, что модификация основания в молекуле S-Ado-Hcy заметно сказывается на ингибиторных свойствах полученных нуклеозидных аналогов. Так, замена в остатке аденина аминогруппы в положении 6 оксигруппой (S-Inp-Hcy) или замена остатка аденина остатками урацила (S-Urd-Hcy) либо цитозина (S-Cyd-Hcy) приводит к образованию соединений с пониженной ингибиторной активностью. Эти данные свидетельствуют о важности аденинового остатка в молекуле S-Ado-Hcy для проявления ингибиторных свойств. К аналогичному выводу пришли Венкстерн и соавт. [6], изучив влияние указанных выше аналогов, включая S-гуанозил-L-гомоцистеин, на процесс ферментативного метилирования тРНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pegg A. — «FEBS Letters», 1971, v. 16, p. 13—16. — 2. Hildesheim J., Hildesheim R., Blanchard P. et al. — «Biochimie», 1973, v. 55, p. 541—546. — 3. Hildesheim J., Hildesheim R., Lederer E. — *ibid.*, 1972, v. 54, p. 989—995. — 4. Hildesheim J., Gouguillon J.-F., Lederer E. — «FEBS Letters», 1973, v. 30, p. 177—180. — 5. Coward J., Bussolotti D., Chang Ch. — «J. med. Chem.», 1974, v. 17, p. 1286—1289. — 6. Коган М. В., Венкстерн Т. В., Рекунова В. Н. и др. — «Молекулярная биол.», 1976, № 1, с. 89—98. — 7. Glick J., Ross S., Leboy Ph. — «Nucl. Acids Res.», 1975, v. 2, p. 1639—1651. — 8. Gold M., Hurwitz J. — «J. biol. Chem.», 1964, v. 239, p. 3858—3865. — 9. Lautenberger J., Linn S. — *Ibid.*, 1972, v. 247, p. 6176—6182. — 10. Рекунова В. Н., Рудакова И. П., Юркевич А. М. — «ЦЖ. общ. химии», 1974, т. 44, с. 1182—1187. — 11. Тихоненко Т. И., Коуделка Я., Борншполец З. И. — «Микробиология», 1963, т. 32, с. 723—726. — 12. Тихоненко Т. И. — «Биохимия», 1962, т. 27, с. 1015—1023. — 13. Тихоненко Т. И., Винецкий Ю. П., Земцова Э. В. — «Микробиология», 1961, т. 30, с. 1020—1027. — 14. Nikolskaya I. I., Lopatina N. G., Debov S. S. — «Biochim. biophys. Acta», 1976, v. 435, p. 206—210. — 15. Никольская И. И., Александрова С. С., Лопатина Н. Г. и др. — «Биохимия», 1976, т. 41, с. 610—621. — 16. Никольская И. И., Ванюшин Б. Ф., Мардашев С. Р. — Там же, 1975, т. 40, с. 1081—1086. — 17. Nikolskaya I. I., Lopatina N. G., Chaplygina N. V. et al. — «Molec. cell. Biochem.», 1976, v. 13, p. 79—87.

Поступила 17/V 1977 г.

ON THE EFFECT OF S-NUCLEOSYL HOMOCYSTEINES ON ACTIVITY OF SEVERAL DNA METHYLASES

I. I. Nikol'skaya, N. G. Lopatina, V. N. Rekunova, A. M. Yurkevich, S. S. Debov

Laboratory of Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, All-Union Research Institute of Vitamins, Moscow

It was studied effect of S-adenosyl, -uridyl, -citidyl and -inosyl homocysteines on activity of bacterial adenine and cytosine methylases from *E. coli* CK as well as on guanine methylase specific for DDVI phage. S-adenosyl homocysteine was shown to be the strong inhibitor of methylation; 10 μ M of the substance inhibited all the enzymes studied by 98—99%. Use of total enzymatic preparations did not enable to find a difference in affinity of S-uridyl, -citidyl and -inosyl homocysteines to various DNA methylases studied. All these preparations inhibited DNA methylases by 55—65%. Increase in concentration of inhibitor up to 20 μ M did not elevate the inhibitory effect. Action of S-nucleosyl homocysteines did not depend on the type of acceptor DNA.

УДК 612.115.3

Б. А. Кудряшов, Л. А. Ляпина, А. М. Ульянов

ЗНАЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА ФИБРИНОГЕН—ГЕПАРИН В ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭУГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ КРОВИ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ ТРОМБИНА ИЛИ ПЛАЗМИНА

Биологический факультет, лаборатория физиологии и биохимии свертывания крови Московского университета им. М. В. Ломоносова

Внутривенное введение плазмينا в отличие от тромбина тормозит или не обеспечивает выброса эндогенного гепарина в кровоток. В этих условиях недостаток гепарина во фракции эуглобулинов и фракции комплекса фибриноген — гепарин, выделенной из эуглобулинов, обуславливал отсутствие в них активности неферментативного фибринолиза. Экзогенный гепарин, вводимый в кровоток или добавляемый к соответствующим фракциям, обеспечивал образование активных комплексных соединений гепарина. В эуглобулиновой фракции плазмы, выделенной из крови животных, которым внутривенно вводили тромбин, около 70% суммарной фибринолитической активности обусловлено комплексом фибриноген — гепарин.

Гепарин в кровотоке образует с рядом белков плазмы крови и некоторыми биогенными аминами комплексные соединения, которые являются важнейшими гуморальными агентами второй противосвертывающей системы (ВПС). Одним из основных свойств комплексов является их способность осуществлять неферментативное растворение нестабилизированного фактором XIII_A фибрина [1]. В последнее время установлено, что фракция продуктов деградации фибриногена и фибрина, выделяемая из плазмы крови в условиях возбуждения ВПС тромбином, состоит преимущественно из комплексов гепарина, среди которых одним из основных является комплекс фибриноген—гепарин [2]. С другой стороны, известно, что плазмин, лизирующий в условиях *in vitro* фибриноген и фибрин до стадии образования продуктов деградации [3, 4—6], при его внутривенном введении обуславливает рефлекторную реакцию организма, направленную на торможение активности ВПС [1, 7, 8].

Задачей настоящего исследования явилось изучение значения комплекса фибриноген — гепарин в фибринолитической активности эуглобулиновой фракции крови после внутривенного введения животным тромбина или плазмина, а также влияния протаминсульфата на этот процесс.

Методика

В экспериментах использовали белых крыс-самцов массой 180—200 г. Для внутривенного введения применяли растворы ³⁵S-гепарина (фирма «Amersham»), тромбина (Каунасское предприятие бактериальных препаратов), плазмина, полученного активацией

плазминогена человека (коммерческий препарат отечественного производства) стрептокиназой (фирма «Behringwerke A. G.») и протаминсульфата (фирма «Спофа»). В I серии опытов животные были разделены на 3 группы. Все они получали внутривенно ^{35}S -гепарин общей радиоактивностью 1 мКи на 200 г массы тела и биологической активностью 2—3 МЕ на 200 г массы. Через 30 с после внутривенного введения гепарина животные 1-й группы получали внутривенно тромбин в дозе 60 вроцлавских единиц в объеме 0,5 мл на 200 г массы. Крысам 2-й группы внутривенно (контроль) вводили 0,85% раствор NaCl в объеме 0,5 мл на 200 г массы. Животные 3-й группы получали внутривенно плазмин в дозе 20 ЕД в объеме 0,5 мл на 200 г массы.

Во II серии экспериментов животным предварительно за 2—3 мин до введения ^{35}S -гепарина в указанной выше дозе вводили 0,6% раствор протаминсульфата в объеме 0,5 мл на 200 г массы с целью блокады неферментативной фибринолитической активности (комплексных соединений гепарина). Животным 1-й группы внутривенно вводили тромбин, 2-й группы — физиологический раствор.

Внутривенное введение препаратов и взятие крови производили через *v. jugularis* с 3,8% цитратом натрия. Кровь брали через 5—7 мин после введения последнего препарата.

Из полученной бестромбоцитарной плазмы выделяли эуглобулиновую фракцию [9], из которой затем получали фракцию комплекса фибриноген — гепарин [10]. Выделение производили следующим образом. К 1 мл плазмы (проба 1) добавляли 4 мл дистиллированной воды и 1% уксусную кислоту до pH 5,2. Смесь стояла при 4°C в течение 15 мин, после чего ее центрифугировали в течение 10 мин при 1800 об/мин. Супернатант 1 отбрасывали, а осадок (эуглобулиновая фракция плазмы) растворяли в 1 мл боратного буфера pH 7,8. Далее к 1 мл раствора эуглобулиновой фракции добавляли охлажденный 53,3% этиловый спирт до 8% насыщения. Через 10—15 мин стояния смеси при 4°C ее центрифугировали в течение 5—10 мин при 1800 об/мин. Полученный осадок 2 представлял собой препарат комплекса фибриноген — гепарин, который растворяли в 1 мл боратного буфера pH 7,8.

В III серии экспериментов провели дополнительный опыт в условиях *in vitro* по воздействию протаминсульфата на фракцию комплекса фибриноген — гепарин, выделенную из плазмы крови. Для этого к 1 мл фракции этого комплекса добавляли 0,1 мл 0,2% раствора протаминсульфата, доводили pH до 2,0—3,0 добавлением 0,1 н. HCl, смесь выдерживали при 4°C в течение 10 мин, после чего центрифугировали при 1800 об/мин в течение 10 мин.

Неферментативную фибринолитическую активность фракций плазмы определяли по методу Кудряшова и Ляшиной [11] на пластинах нестабилизированного фибрина, приготовленных по методу Кудряшова и соавт. [12]. Для определения радиоактивности, связанной с ^{35}S -гепарином, пробы обрабатывали по методу Герберга [13]. Определение радиоактивности проводили на приборе «Mark-11» фирмы «Nuclear Chicago» (США).

Результаты и обсуждение

Как следует из данных табл. 1, в I серии экспериментов, внутривенное введение тромбина вызывало выраженную активацию ВПС. Об этом свидетельствует увеличение суммарной фибринолитической активности, неферментативного фибринолиза (НФ) как в плазме крови, так и в эуглобулиновой фракции, появление активной фракции комплекса фибриноген — гепарин, выделенной из эуглобулинов, по сравнению с 2-й (контрольной) группой животных, получавших 0,85% NaCl. Так, СФА плазмы в опытной группе животных увеличилась в 2,1 раза, НФ плазмы — в 3,7 раза, СФА и НФ эуглобулиновой фракции — соответственно в 5,3 и 10,9 раза по сравнению с контрольной группой. Фракция комплекса фибриноген — гепарин, выделенная из эуглобулинов, увеличилась в 4,5 раза по сравнению с контролем (см. табл. 1).

У животных 3-й группы после введения плазмина (20 ЕД) выявлялось значительное угнетение функции ВПС, что выражалось в практически полном отсутствии как ферментативного, так и неферментативного фибринолиза в исследуемых фракциях. Добавление протаминсульфата к фракции комплекса фибриноген — гепарин полностью блокировало литическую активность такого комплекса, выделенного из эуглобулинов, у животных всех групп (см. табл. 1). Подобная же блокада НФ, осуществляемого комплексными соединениями гепарина, как в плазме крови, так и в эуглобулиновой фракции наблюдалась в условиях *in vivo* (табл. 2). На фоне внутривенного введения протаминсульфата НФ у животных всех групп отсутствовал.

Анализ распределения радиоактивности (табл. 3) показал, что во фракции эуглобулинов содержание ^{35}S -гепарина составляло 49,6% его содер-

жания в плазме крови в группе животных, получавших тромбин (1-я группа), по сравнению с 33,1 % в контрольной группе животных (2-я группа); при этом ^{35}S -гепарин, входящий в состав комплекса фибриноген — гепарин, составляет 67,3 % общей активности ^{35}S -гепарина во фракции эуглобулинов. Количество этого комплекса во фракции эуглобулинов в контрольной группе ниже (см. табл. 3). Добавление протаминсульфата к фракции комплекса фибриноген — гепарин из эуглобулинов показывает, что практически весь гепарин связывается с протаминсульфатом и выпадает в осадок (см. табл. 3).

Предварительное внутривенное введение протаминсульфата вызывает резкое снижение содержания меченого гепарина в крови (до 17,7—18,5 % исходного уровня). Снижается также уровень ^{35}S -гепарина, входящего во фракцию эуглобулинов (до 27,5 против 45,5 % в контроле) и во фракции комплекса фибриноген — гепарин, выделенной из эуглобулинов (до 35,7 против 51,2 % в контроле).

Однако относительный уровень ^{35}S -гепарина, определяемый во фракции эуглобулинов и во фракции комплекса фибриноген — гепарин, выделенной из эуглобулинов, в этих условиях повышается (табл. 4).

Внутривенно введенный плазмин обуславливает более значительное, чем тромбин, включение меченого гепарина во фракцию эуглобулинов и комплекса фибриноген — гепарин из эуглобулинов (см. табл. 3). Однако при этом необходимо учитывать, что, как известно, внутривенное введение плазмина, вызывая торможение функциональной активности ВПС, резко снижает выделение в кровь гепа-

Т а б л и ц а 1
СФА (в мм^2) и НФ (в мм^3) плазмы крови и ее эуглобулиновой фракции

Группа животных	Статистический показатель	Плазма крови		Эуглобулиновая фракция		Супернатант I от эуглобулинов		КФГ из эуглобулинов	Супернатант		
		СФА	НФ	СФА	НФ	СФА	НФ		2 от КФГ	2 от КФГ + протамин-сульфат	3 (фибриноген)
1-я	M $\pm m$ n P	99,5 10,1 6 <0,001	53,8 6,2 6 <0,001	106 6,7 6 <0,001	43,6 4,4 5 <0,001	15,3 4,8 6 <0,001	5,3 3,9 6 <0,001	27,1 2,2 6 <0,001	0 0 6 >0,5	0 0 6 >0,5	0 0 6 >0,5
2-я	M $\pm m$ n P	47 3,1 3,3 2,0 6 <0,001	14,6 2,0 0 0 6 <0,001	20 0 0 0 6 <0,001	4 0 0 0 6 <0,001	0 0 0 0 6 >0,5	0 0 0 0 6 >0,5	6,0 1,2 0 0 6 <0,01	0 0 6 >0,5	0 0 6 >0,5	0 0 6 >0,5
3-я	M $\pm m$ n P	3,3 2,0 6 <0,001	0 0 6 <0,001	0 0 6 <0,001	0 0 6 <0,001	0 0 6 >0,5	0 0 6 >0,5	0 0 6 >0,5	0 0 6 >0,5	0 0 6 >0,5	0 0 6 >0,5

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2—4 КФГ — комплекс фибриноген — гепарин. Статистические показатели рассчитаны по отношению к контролю.

рина из его тканевых депо [2]. Следовательно, фиксируемый нами факт увеличения включения индикаторных доз меченого гепарина в исследуемой фракции, очевидно, не отражает истинного поведения эндогенного гепарина в крови в данных условиях.

Т а б л и ц а 2

СФА (в мм²) и НФ (в мм²) плазмы крови животных, получавших ³⁵S-гепарин и тромбин на фоне введения протаминсульфата

Условия опыта	Статистический показатель	Плазма крови		Эуглобулиновая фракция		Фракция КФГ
		СФА	НФ	СФА	НФ	
Протаминсульфат+ ³⁵ S-гепарин+тромбин	<i>M</i>	67,6	0	57	0	0
	$\pm m$	4,4	0	5,8	0	
	<i>n</i>	5	5	5	5	5
	<i>P</i>	<0,01	>0,5	<0,01	>0,5	>0,5
Протаминсульфат+ ³⁵ S-гепарин+NaCl	<i>M</i>	16,5	0	14,5	0	0
	$\pm m$	2,7	0	0,9	0	
	<i>n</i>	6	6	6	6	6

П р и м е ч а н и е. Статистические показатели рассчитаны относительно контрольных проб с NaCl.

Т а б л и ц а 3

Удельная радиоактивность, обусловленная введением ³⁵S-гепарина, фракций плазмы крови (в % по отношению к удельной радиоактивности плазмы крови; $M \pm m$)

Условия опыта	Плазма крови	Фракция эуглобулинов по отношению к плазме крови	Фракция КФ эуглобулинов по отношению к плазме крови	Супернатант фракции (КФГ из эуглобулинов+ протаминсульфат) по отношению к плазме крови
Внутривенное введение тромбина (<i>n</i> =6)	100	49,6 \pm 4,1	33,4 \pm 2,8	2,1 \pm 0,6
Внутривенное введение 0,85% NaCl (<i>n</i> =3)	100	33,1 \pm 4,5	21,2 \pm 3,2	1,3 \pm 0,4
Внутривенное введение плазмينا (<i>n</i> =6)	100	58,7 \pm 4,7	52,1 \pm 4,7	4,1 \pm 0,8

Т а б л и ц а 4

Удельная радиоактивность, обусловленная введением ³⁵S-гепарина, фракций плазмы крови (в % по отношению к удельной радиоактивности плазмы крови) при внутривенном введении протаминсульфата ($M \pm m$)

Условия опыта	Плазма крови	Фракция эуглобулинов	Фракция КФГ из фракции эуглобулинов
Внутривенное введение тромбина (60 ЕД) (<i>n</i> =5)	100	78,0 \pm 5,4	67,4 \pm 4,7
Внутривенное введение 0,85% раствора NaCl (<i>n</i> =6)	100	82,1 \pm 5,6	59,3 \pm 4,8

Это следует из данных табл. 1, показывающих отсутствие НФ исследуемых фракций на фоне внутривенного введения плазмينا.

Для проверки этого предположения была поставлена серия опытов, в которой к фракциям эуглобулинов и комплекса фибриноген — гепарин, выделенного из эуглобулинов, в объеме 1 мл на фоне внутривенного введения индикаторных доз гепарина (2—3 ЕД) и плазмينا (20 ЕД) добавляли различные количества гепарина. Установлено, что после добавления гепа-

рина в дозе 0,2—2 ЕД на 1 мл в исследуемых фракциях проявлялся НФ активностью 20—26 мм².

Внутривенное введение гепарина (40 ЕД) на фоне введения индикаторных доз гепарина и плазмина (20 ЕД) также вызывало появление литической активности в изучаемых фракциях (табл. 5).

Т а б л и ц а 5

Влияние дополнительного к плазмину внутривенного введения гепарина (40 ЕД на 200 г) на фибринолитические свойства плазмы

Условия опыта	Статистический показатель	СФА, мм ²	НФ, мм ²
Внутривенное введение плазмина (20 ЕД) и 0,85% NaCl	<i>M</i>	6,8	0,8
	$\pm m$	2,4	0,09
	<i>n</i>	5	5
Внутривенное введение гепарина (40 ЕД) и плазмина (20 ЕД)	<i>M</i>	61,2	33,8
	$\pm m$	4,1	3,3
	<i>n</i>	5	5
	<i>P</i>	<0,001	<0,001
Внутривенное введение гепарина (40 ЕД) и 0,85% NaCl	<i>M</i>	55,5	32,0
	$\pm m$	6,9	2,8
	<i>n</i>	4	4
	<i>P</i>	<0,001	<0,001
Внутривенное введение 0,85% NaCl и 0,85% NaCl	<i>M</i>	36,0	9,0
	$\pm m$	2,7	2,2
	<i>n</i>	10	10

П р и м е ч а н и е. Статистические показатели рассчитаны относительно проб после внутривенного введения плазмина и NaCl.

Полученные данные подтверждают тот факт, что внутривенно введенный плазмин в отличие от тромбина тормозит или не обеспечивает выброса эндогенного гепарина в кровотоке. При этом именно недостаток гепарина во фракции эуглобулинов и комплексе фибриноген — гепарин, выделенном из эуглобулинов, обуславливал в них отсутствие активности НФ. Экзогенный гепарин, вводимый в кровоток или добавляемый к соответствующим фракциям, обеспечивал образование активных комплексных соединений гепарина, проявляющих свое литическое действие в отношении нестабилизированного фибрина. Полученные данные свидетельствуют также о том, что в эуглобулиновой фракции плазмы, выделенной из крови животных, получавших внутривенную инъекцию тромбина, около 70 % суммарной фибринолитической активности обусловлено комплексом фибриноген — ³⁵S-гепарин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М., 1975. — 2. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. — «Биохимия», 1977, т. 42, № 3, с. 451—459. — 3. Белицер В. А., Варсцкая Т. В. — В кн.: Система свертывания крови и фибринолиз. Ч. 1, Саратов, 1975, с. 86—87. — 4. Niewiarowski S., Kowalski E. — In: Transactions of 6-th Congress of the European Society of Haematology. Copenhagen, 1957, p. 561, Separatum, 158. — 5. Idem. — «Revue d'Hematologie», 1958, v. 13, p. 320—328. — 6. Triantaphyllidis D. C. — «Canad. J. Biochem.», 1958, v. 39, p. 249. — 7. Кудряшов Б. А., Калишевская Т. М. — «Бюлл. экспер. биол.», 1963, № 9, с. 29. — 8. Кудряшов Б. А., Пасторова В. Е. — «Докл. АН СССР», 1960, т. 130, с. 1382. — 9. Kowalski E., Корес М., Niewiarowski S. — «J. clin. Path.», 1959, v. 12, p. 215. — 10. Кудряшов Б. А., Калишевская Т. М., Ляпина Л. А. — «Вопр. мед. химии», 1968, № 3, с. 2277—282. — 11. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. — «Лаб. дело», 1971, № 6, с. 326—329. — 12. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Баскова И. П. — «Вестн. Московск. ун-та. Серия биол.», 1974, № 5, с. 41—45. — 13. Herberg R. J. — «Analyt. Chem.», 1960, v. 32, p. 42—46.

Поступила 24/V 1977 г.

IMPORTANCE OF FIBRINOGEN-HEPARIN COMPLEX IN FIBRINOLYTIC ACTIVITY OF BLOOD EUGLOBULIN FRACTION AFTER INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF THROMBIN OR PLASMIN

B. A. Kudryashov, L. A. Liapina, A. M. Ul'yanov

Laboratory of Physiology and Biochemistry of Blood Coagulation, Biological Faculty,
M. V. Lomonosov State University, Moscow

Intravenous administration of plasmin as distinct from thrombin inhibited or did not provide a secretion of endogenous heparin into circulation. In these conditions non-enzymatic fibrinolysis was not observed both in fraction of euglobulins and in fibrinogen-heparin complex, isolated from euglobulins, due to insufficiency of heparin. Exogenous heparin, injected into circulation or added to corresponding fractions, enabled to produce the active heparin complexes. About 70% of total fibrinolytic activity was due to fibrinogen-heparin complex in euglobulin fraction of blood plasma, isolated from blood of animals intravenously administered with thrombin.

УДК 616.391.04-02:577.161.31-07:616-008.939.15-085.356:577.161.5

И. И. Уласевич

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА К НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В УСЛОВИЯХ Е-АВИТАМИНОЗА

Кафедра биохимии Алтайского медицинского института, Барнаул

Содержание малонового диальдегида (МДА) при Е-авитаминозе повышается по сравнению с контролем в 2 раза в печени и почти в 5 раз в мышцах. У животных, получавших на фоне Е-авитаминозного рациона по 2 мг викасола в сутки, содержание МДА в печени сохраняется в пределах нормы, а в мышцах возрастает только в 2 раза.

Ранее нами была показана функциональная взаимосвязь в животном организме родственных по химической структуре витаминов Е и К. Установлено, что обогащение организма α -токоферолом полностью или частично предохраняет от ряда биохимических нарушений, характерных для К-витаминной недостаточности [1, 2]. В то же время метаболические изменения, свойственные Е-авитаминозу, можно смягчить и даже устранить с помощью витамина К [3—6].

Природа взаимоотношений α -токоферола и витамина К в организме остается неясной. Сходство химической структуры и возможность взаимопревращений позволяют предположить наличие общих метаболитов, характеризующихся Е- и К-витаминной активностью [7].

Одним из характерных свойств α -токоферола является его антиоксидантная активность. Сведений об антиокислительном действии викасола в организме животных мы не нашли. Целью настоящей работы было выяснение влияния витамина К (викасола) на перекисное окисление липидов в тканях белых крыс, лишенных витамина Е.

По тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) мы определяли малоновый диальдегид (МДА). Несмотря на то что перекиси липидов непосредственно с ТБК не реагируют, хорошая корреляция между содержанием перекисей и МДА позволяет использовать этот тест для исследования липопероксидации [8].

Методика

Опыты проводили на беспородных крысах-самцах с исходным весом 70—80 г, разделенных на 4 группы. Животные находились на искусственном рационе, содержащем 21% казеина, 58% крахмала, 5% ячменя, 5% линетолы, 4% солевой смеси [9], 6% пивных дрожжей и 1 г витаминной смеси [10]. Казеин подвергали ультрафиолетовому облучению в течение 45 мин с целью разрушения витамина Е. Животным 1-й и 2-й групп перорально вводили по 2 мг D, L- и α -токоферолаацетата в сутки; при этом животные 1-й группы получали рацион вволю, а 2-й (спаренный контроль) — ограниченное питание, калорийность которого была эквивалентной питанию опытной группы (4-й); животные 3-й группы полу-

чали ежедневно перорально по 2 мг викасола; крысы 4-й группы добавок к диете не получали. К концу опыта (6 мес) средний вес крыс 1—4-й групп соответственно составил 419, 360, 402 и 309 г. Критериями развития Е-авитаминоза, кроме снижения веса, служили депигментация зубов и снижение резистентности эритроцитов к перекиси водорода и диалуровой кислоте [4]. МДА определяли в гомогенатах печени и мышц по тесту с ТБК [11], количество МДА рассчитывали по молярному коэффициенту поглощения, равному 156 000, и выражали в микромолях на 1 мг ткани.

Результаты и обсуждение

Исследование содержания МДА в гомогенатах печени и мышц показало односторонние его изменения в этих тканях.

У животных 2-й группы, получавших витамин Е и ограниченное количество корма, исследуемый показатель был таким же, как в контрольной группе крыс, получавших витамин и корм без ограничения. Эти данные свидетельствуют, что изменения содержания МДА в тканях подопытных крыс не являются следствием голодания, а связаны лишь с отсутствием или наличием в рационе витаминов.

Влияние викасола на содержание малонового диальдегида в тканях крыс при Е-авитаминозе

Ткань	Группа животных				$P_{1,3}$	$P_{1,4}$
	1-я	2-я	3-я	4-я		
Печень	$104 \pm 20,6$	$103 \pm 22,2$	$103 \pm 11,9$	$216 \pm 23,6$	—	$<0,01$
Мышцы	$53,6 \pm 4,3$	$54,8 \pm 7,6$	$109 \pm 17,6$	$261 \pm 61,0$	$<0,05$	$<0,01$

Как видно из таблицы, Е-авитаминоз приводит к повышению количества МДА в сравнении с контролем в 2 раза в печени и почти в 5 раз в мышцах.

У животных 3-й группы, получавших викасол, содержание МДА в печени оставалось в пределах нормы, в мышцах возрастало лишь в 2 раза.

Таким образом, способность витамина К устранять или смягчать симптомы Е-витаминной недостаточности, по-видимому, объясняется наличием антиокислительного эффекта у викасола, наиболее четко проявившегося при исследовании печени. Этот факт заслуживает дальнейшего изучения в плане взаимодействия жирорастворимых витаминов и их практического использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Матусис И. И., Уласевич И. И. — «Биохимия», 1966, т. 31, с. 654—658.
2. Они же. — «Успехи совр. биол.», 1967, с. 415.
3. Уласевич И. И., Печенина И. И. — «Вопр. мед. химии», 1974, № 2, с. 163—165.
4. Уласевич И. И. — В кн.: Биоантиокислители и регуляция окислительных процессов в клетке. М., 1972, с. 83—84.
5. Уласевич И. И. — Тезисы докладов Всесоюзной конференции по мышечной биохимии. М. — Л., 1966, с. 132.
6. Уласевич И. И. — «Бюлл. exper. биол.», 1970, № 7, с. 55—57.
7. Матусис И. И. — В кн.: Витамины. Вып. 8. Киев, 1975, с. 71.
8. Ланкин В. З., Гуревич С. М., Буракова Е. Б. — В кн.: Биоантиокислители. М., 1975, с. 73.
9. Hubbel R. B., Mendel L. B., Wakeman A. J. — «J. Nutr.», 1937, v. 14, p. 273.
10. Saville P. D. — Ibid., 1967, v. 91, p. 353.
11. Zalkin H., Tappel A. L. — «Arch. Biochem.», 1960, v. 88, p. 115.

Поступила 7/VI 1977 г.

EFFECT OF VITAMIN K ON PEROXIDATION OF LIPIDS IN E-AVITAMINOSIS

I. I. Ulasevich

Chair of Biochemistry, Altai Medical School, Barnaul

Content of malonic dialdehyde was increased 2-fold in liver homogenates of E-avitaminous animals and 5-fold in muscle homogenates. In animals, maintained at E-avitaminous diet but treated with vitamin K, content of malonic dialdehyde in liver homogenates was similar to its content in controls; it increased only 2-fold in muscle homogenates.

З. К. Никитина, С. С. Шишкин, С. В. Томашевич,
С. С. Дебов

ИЗУЧЕНИЕ ДЕГРАДАЦИИ РИБОСОМНОЙ РНК В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ КРЫС В ПРОЦЕССЕ АВТОЛИЗА

Научно-исследовательская лаборатория Министерства здравоохранения СССР, Москва

При сравнительном гистохимическом исследовании содержания РНК из нормальной и автолизированной (в течение 72 ч) мышечной ткани обнаружена хорошая сохранность нуклеиновой кислоты в процессе автолиза и одновременно признаки деструкции ткани. Выявлена зависимость степени полимерности рРНК из автолизированной ткани от температуры хранения животных после забоя. Изменение температуры хранения от 0 до 21°C не вызывало изменения выхода рРНК. При помощи формамидной и температурной обработки обнаружены скрытые разрывы в рРНК, количество которых возрастает с увеличением времени, прошедшего после смерти животного, и с повышением температуры хранения. Предполагается, что скрытые разрывы в рРНК накапливаются в тканях животного в процессе автолиза.

Исследование количественных и качественных изменений РНК в процессе посмертной деградации тканей может служить удобным подходом к изучению механизмов распада этой нуклеиновой кислоты. В предыдущей работе было показано, что в течение 3 сут автолиза, проходившего при комнатной температуре, содержание рРНК и суммарной РНК в мышечной ткани крыс менялось незначительно. При этом отмечалось некоторое изменение соотношения между 28S-, 18S- и 5S-компонентами в рРНК [1]. Поскольку температура хранения животных после смерти может оказывать влияние на интенсивность автолитических изменений в тканях [2], в данной работе мы исследовали влияние температуры хранения на свойства рРНК, экстрагируемой из автолизированных мышц.

В литературе имеется ряд данных о возможности существования скрытых разрывов в молекуле РНК, которые могут быть стабилизированы водородными связями или мостиками металлов и не выявляются при обычном градиентном центрифугировании [3—5]. В связи с этим в данной работе было предпринято более детальное исследование рРНК на разных стадиях автолиза с целью выяснения вопроса о возможности накопления разрывов в рРНК в процессе посмертной деструкции ткани. Параллельно с биохимическим анализом проводили проверку сохранности РНК в автолизированной мышечной ткани гистохимическими методами.

Методика

В работе использовали мышцы задних конечностей белых беспородных крыс, забитых перед опытом или за 24, 48 и 72 ч до опыта. Тушки животных хранили после забоя при 0, 10, 16, 19 и 21°C, используя холодильную камеру «Солога».

Гистохимическое исследование содержания РНК. Для гистохимического исследования содержания РНК кусочки мышечной ткани фиксировали в формалине в течение 12 ч или в жидкости Карнуа в течение 2 ч. Обезжизивание и заливку в парафин осуществляли по общепринятой схеме. В отдельных случаях фиксированный материал резали на замораживающем микротоме. Срезы окрашивали метиловым зеленым пиронином [6] и галлоцанин-хромовыми квасцами [7]. Ферментативный контроль осуществляли РНК-азой фирмы «Reanal» (Венгрия).

Анализ рРНК. рРНК из нормальных и автолизированных мышц выделяли холодной фенольной экстракцией из полисом, как описано ранее [1]. Скрытые разрывы в рРНК выявляли при помощи температурной и формамидной обработки препаратов по описанному методу [8] с небольшими модификациями.

Температурная обработка рРНК. Осадок рРНК растворяли в воде так, чтобы 0,1 мл раствора содержал 1—2 опт. ед. E_{260} . 0,4 мл раствора нагревали на водяной бане при различной температуре (45, 55, 60 и 70°C) в течение 1 мин, затем препараты охлаждали на ледяной бане. Контролем к каждой пробе служил непрогретый препарат РНК. На 4,6 мл линейного сахарозного градиента (20—5%), приготовленного на 0,01 М натрий-ацетатном буфере pH 5,2, содержавшем 200 мкг/мл декстран-сульфата, наслаивали 0,3 мл водного раствора РНК и центрифугировали на центрифуге «Spinco L5» в роторе SW 50.1 при

47 500 об/мин в течение $3\frac{1}{2}$ ч. Анализ распределения РНК в градиенте плотности сахарозы проводили, как описано ранее [1].

Обработка РНК формамидом. Осадок РНК, полученный после переосаждения спиртом, растворяли в 2 мл раствора формамида разной концентрации (20, 40, 60 и 80%) так, чтобы в 1 мл раствора содержалось 1—2 опт. ед. E_{260} . Растворы формамида перед опытом нейтрализовали до pH 7,2 прибавлением Na_2CO_3 . Затем образцы инкубировали на водя-

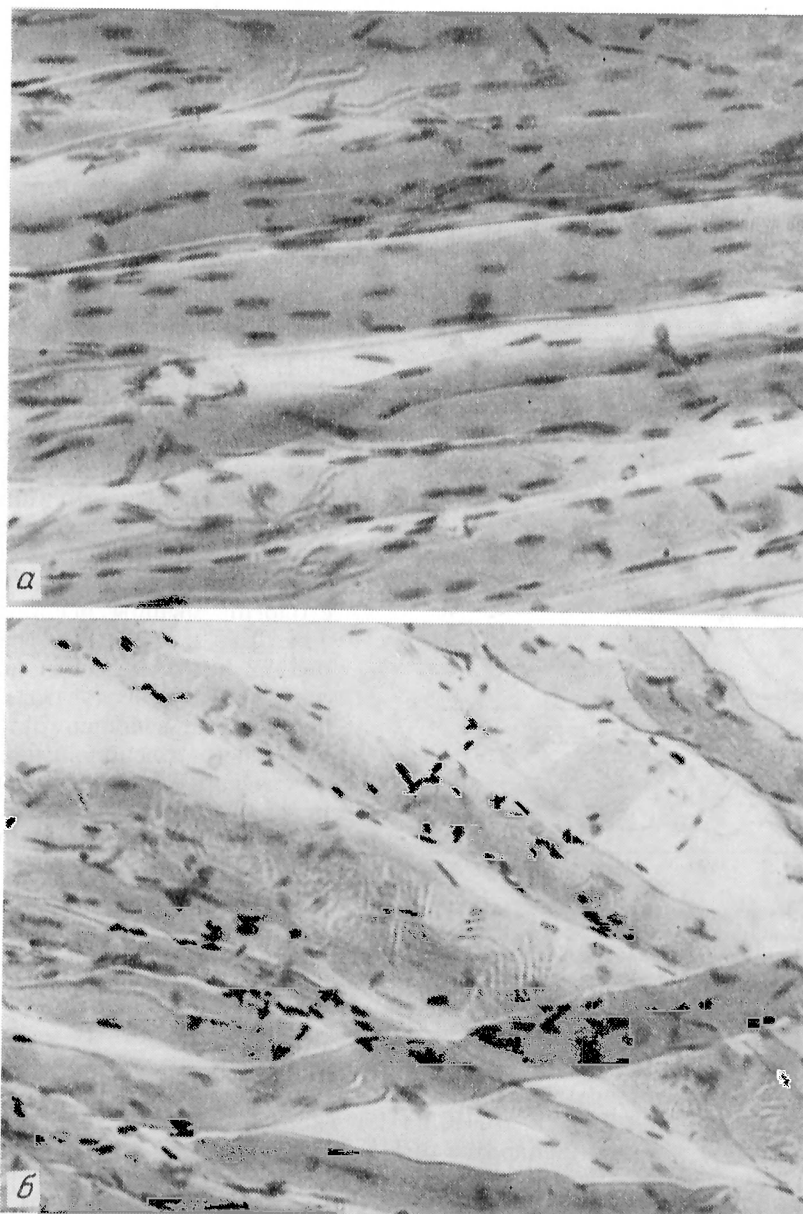


Рис. 1. Препараты нормальной (а) и автолизированной в течение 72 ч (б) мышечной ткани. Ув. $\times 40$.

ной бане в течение 10 мин при $40^\circ C$, после чего к пробам добавляли 8 мл воды. Из полученного раствора осаждали РНК прибавлением 25 мл спирта и 1 мл 1% $NaCl$ и оставляли на ночь при $-20^\circ C$. Контролем служили препараты рРНК, растворенные в воде, а затем переосажденные спиртом. Осадок РНК получали центрифугированием и растворяли в воде так, чтобы в 0,1 мл раствора содержалось 0,5—1 опт. ед. E_{260} . Анализ распределения РНК в градиенте плотности сахарозы проводили, как описано выше.

Исследование содержания РНК в нормальной и автолизированной мышечной ткани, проведенное ранее биохимическими методами, не выявило существенных изменений выхода нуклеиновой кислоты в процессе посмертной деструкции ткани [1]. Выполненное в данной работе сравнительное исследование нормальной и автолизированной (в течение 72 ч) мышечной ткани при окраске ее метиловым зеленым пиронином и галлоцианин-хромовыми квасцами для обнаружения РНК выявилось лишь незна-

чительное снижение интенсивности окраски автолизированных препаратов (рис. 1). Равномерность и диффузность окраски при исследовании для обнаружения РНК в посмертно измененных образцах сохранились. Снижение интенсивности окраски наблюдалось главным образом в мышечных волокнах с наиболее поврежденной структурой, особенно по периферии препарата. Вместе с тем в автолизированных препаратах обнаруживалась определенная деструкция мышечной ткани, в целом соответствующая имеющимся в литературе данным об изменении гистологии мышц после смерти [2]. Так, в мышечной ткани через 72 ч после смерти нарушалась параллельность мышечных волокон, отмечались отдельные продольно расположенные дефекты сарколеммы, смазанность поперечной исчерченности. Многие ядра находились на разных стадиях пикнотической дегенерации.

Хранение тушек животных после смерти при 0, 10, 16, 19 и 21°C не приводило к закономерному изменению выхода рРНК из скелетных мышц в зависимости от температуры хра-

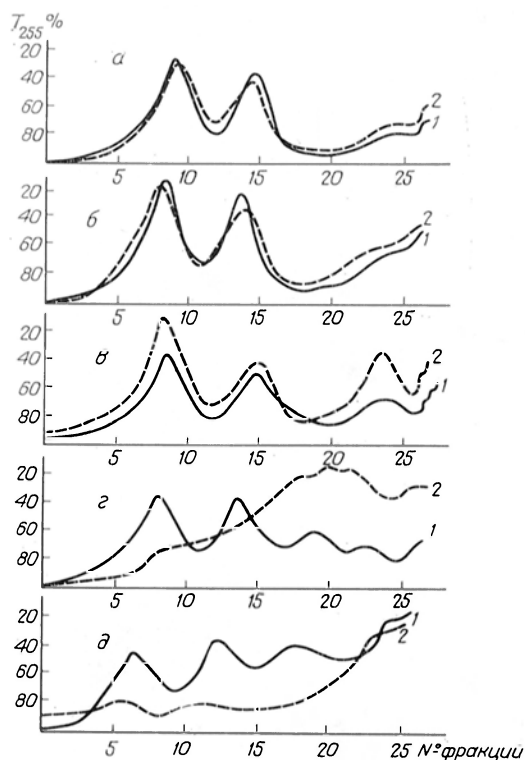


Рис. 2. Распределение препаратов рРНК из автолизированной в течение 72 ч мышечной ткани в градиенте плотности сахарозы.

а — температура хранения животных после забоя 0°C; б — 10°C; в — 15—17°C; г — 18—20°C; д — 20—22°C. 1 — контрольный препарат; 2 — обработка рРНК при 70°C в течение 1 мин.

нения. Суммировав результаты всех измерений, мы обнаружили, что выход составлял 100 ± 20 мкг рРНК на 1 г ткани. На рис. 2 представлены кривые распределения препаратов рРНК, выделенных из мышц животных через 3 сут после смерти и хранившихся при разной температуре. При хранении тушек животных ниже 18°C не происходило заметного изменения полимерности рРНК (рис. 2, а—в). Повышение температуры хранения приводило к изменению соотношения между 28S-, 18S- и 5S-компонентами нуклеиновой кислоты в сторону увеличения низкомолекулярных компонентов (рис. 2, г, д). В дальнейшем основные эксперименты мы проводили при температуре хранения 18—20°C.

В настоящее время в литературе имеется ряд данных, указывающих на возможность выявления методами формамидной и температурной обработки скрытых разрывов в рРНК, которые не удается обнаружить при обычном центрифугировании в градиенте плотности сахарозы [4, 5]. В связи с

этим было проведено сравнительное исследование рРНК из нормальной и автолизированной ткани указанными методами с целью выяснения возможности образования скрытых разрывов в процессе автолиза. На рис. 3 представлены кривые распределения препарата рРНК из нормальной и автолизированной в течение 3 сут ткани в градиенте плотности сахарозы, предварительно прогретых при разной температуре в течение 1 мин. Увеличение

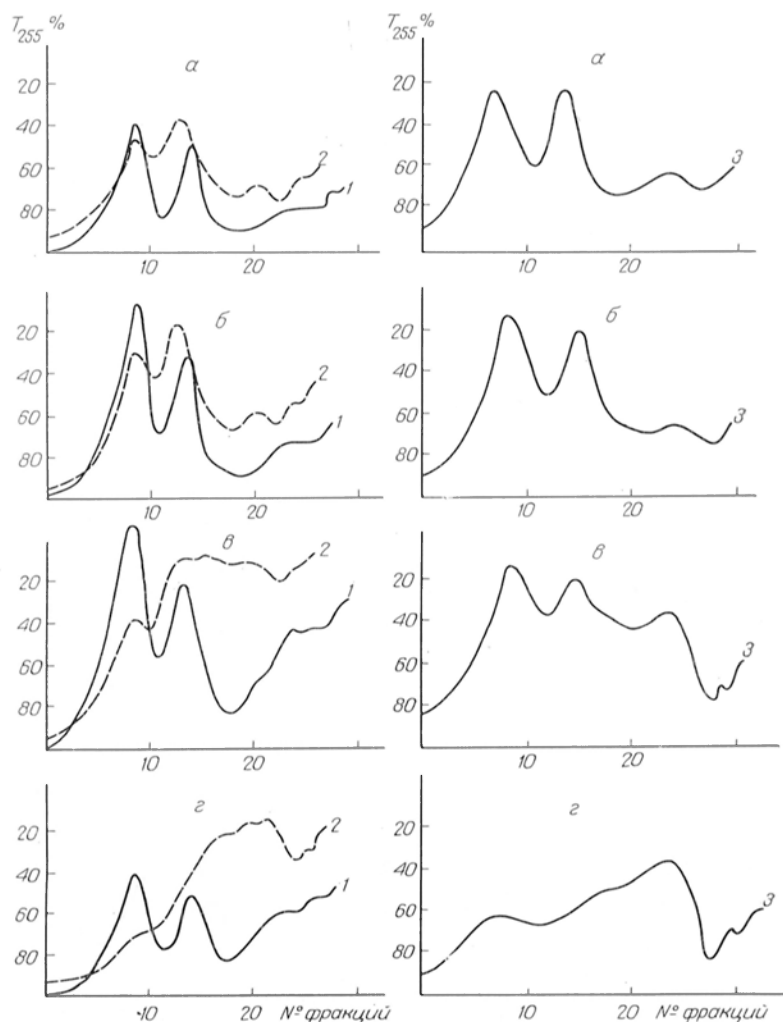


Рис. 3. Распределение препаратов рРНК из нормальной и автолизированной в разное время мышечной ткани в градиенте плотности сахарозы. *а* — нормальная ткань; *б* — через 24 ч после забоя; *в* — через 48 ч после забоя; *г* — через 72 ч после забоя. 1 — контрольный препарат; 2 — обработка рРНК при 70°C в течение 1 мин; 3 — обработка РНК 80% раствором формамида.

температуры при прогревании препарата из нормальной ткани от 45 до 70°C приводило к незначительному росту низкомолекулярных компонентов рРНК, который не сопровождался появлением дополнительных пиков оптической плотности на градиенте. Незначительная деградация РНК из нормальной ткани, наблюдаемая при ее температурной обработке, заметно отличалась от картины фрагментации рРНК, полученной другими авторами [8], и согласуется с представлением о непрерывности основной массы молекул рРНК [9]. Были обнаружены некоторые особенности распределения в градиенте плотности сахарозы препаратов РНК, подвергнутых

кратковременной температурной обработке; изменение соотношения компонентов, небольшие изменения положения пиков на градиенте (не более 1 фракции), некоторое количество агрегатов (оптически плотный материал, седиментирующий в области более 28S). Все эти особенности, по-видимому, связаны с денатурацией нуклеиновой кислоты, что находится в соответствии с имеющимися в литературе данными [10]. Нужно отметить, что обра-

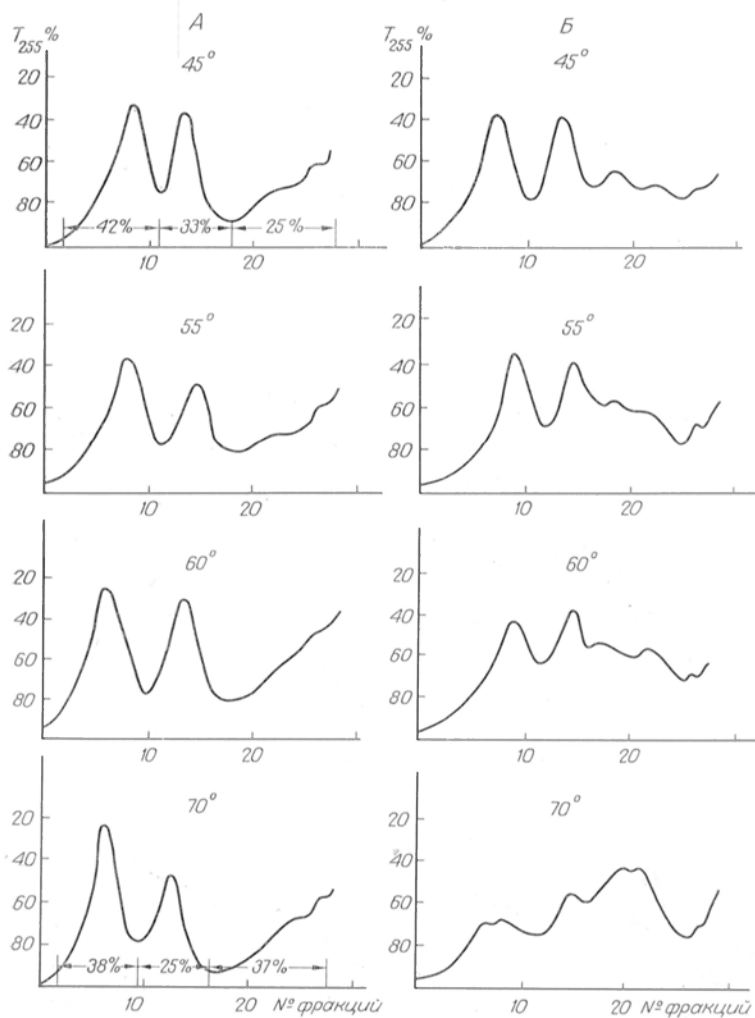


Рис. 4. Распределение препаратов рРНК из нормальной и автолизированной в течение 72 ч мышечной ткани в градиенте плотности сахаразы после температурной обработки.

А — нормальная ткань; Б — ткань после автолиза.

зование агрегатов наблюдалось и при обработке препаратов рРНК формамидом и предотвращалось добавлением в градиентные растворы 200 мкг/мл декстран-сульфата.

Температурная обработка рРНК из автолизированной ткани при 45 и 55°C приводила к небольшому изменению соотношения между 28S-, 18S- и 5S-компонентами по сравнению с контролем. Дальнейшее повышение температуры до 60°C вызывало появление фрагментов в области 28S—18S и 18S—4S. Обработка препарата при 70°C значительно изменяла распределение рРНК в градиенте и приводила к дальнейшему увеличению низкомолекулярных компонентов по сравнению с высокомолекулярными

(рис. 4). Несмотря на то что мы использовали очень кратковременную температурную обработку, нельзя было исключить возможности разрушения рРНК из автолизированных мышц следовыми количествами РНК-аз, содержащихся в полученных препаратах. В связи с этим был проведен ряд экспериментов с применением ингибиторов РНК-аз. Добавление к образцам нуклеиновой кислоты 200 мкг/мл декстран-сульфата, 90 % раствора фенола (равный объем) и 5 мкг/мл поливинил-сульфата не оказывало ингибирующего влияния на образование разрывов при последующем прогревании

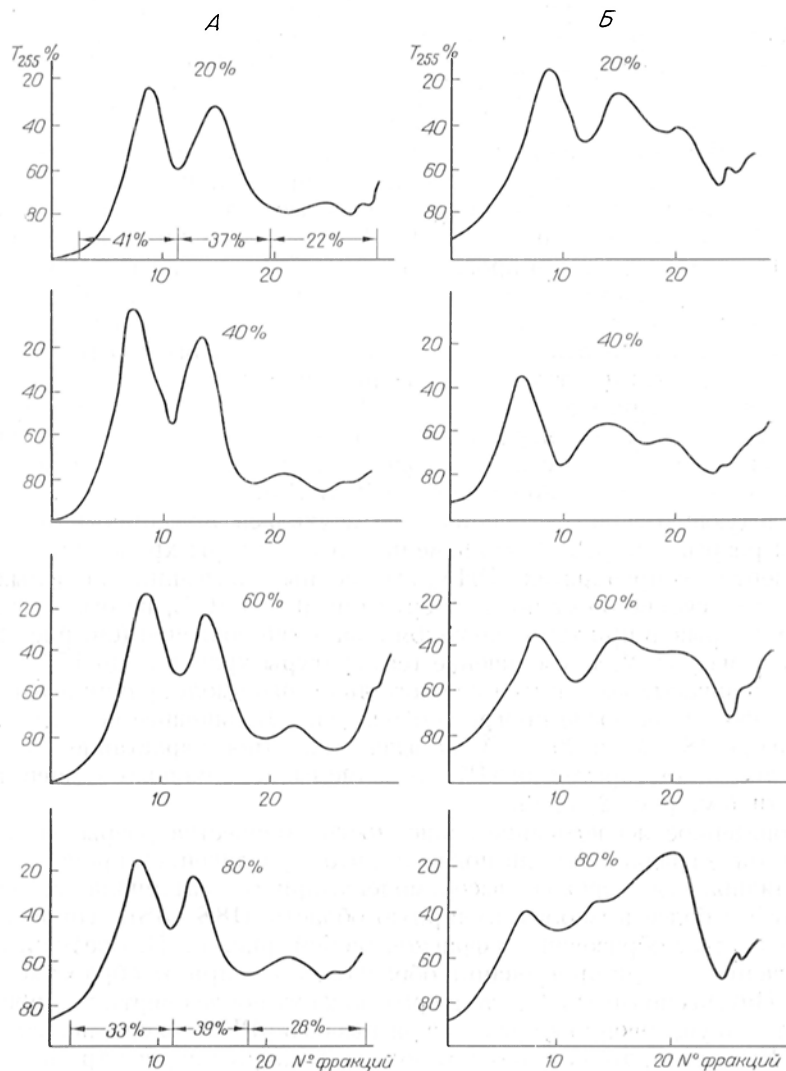


Рис. 5. Распределение препаратов рРНК из нормальной и автолизированной в течение 72 ч мышечной ткани в градиенте плотности сахарозы после обработки растворами формамида.

А — нормальная ткань; Б — ткань после автолиза.

этих препаратов при 70°C. Таким образом, описанные изменения нуклеиновой кислоты из автолизированной ткани, по-видимому, связаны с выявлением скрытых разрывов в молекулах рРНК, а не с действием примесей РНК-азы, так как использование ингибиторов РНК-аз не приводит к изменению степени деградации биополимера.

В отдельных серии экспериментов препараты рРНК из нормальной и автолизированной ткани обрабатывали растворами формамида разной кон-

центрации (от 20 до 80 %). Было обнаружено, что при концентрации формамида менее 80 % не наблюдается изменения распределения рРНК из нормальной ткани в линейном градиенте плотности сахарозы (см. рис. 4). Обработка тех же препаратов 80 % формамидом вызывала небольшое изменение соотношения между 28S-, 18S- и 5S-компонентами, которое, по-видимому, можно рассматривать как деагурационное изменение нуклеиновой кислоты под действием формамида. Устойчивость рРНК из мышцы животного через 3 сут после смерти к действию формамида была значительно ниже устойчивости нуклеиновой кислоты из нормальной ткани. Применение 60 % раствора формамида вызывало изменение соотношения между 28S-, 18S и 5S-компонентами и фрагментацию РНК (рис. 5), а повышение концентрации формамида до 80 % приводило к дальнейшему переходу высокомолекулярного материала в область 18S—4S.

Таким образом, в наших экспериментах было выявлено, что препараты рРНК, выделенные из нормальной и автолизированной в течение 3 сут ткани, характеризуются различной устойчивостью к температурной и формамидной обработке. В то время как рРНК из нормальной ткани после обработки 80 % формамидом или прогревании при 70°C сравнительно мало отличается от контрольного препарата, значительная часть рРНК из автолизированной ткани распадается на фрагменты. Поскольку и формамидная, и температурная обработка является методом выявления скрытых разрывов в РНК [3, 8], можно считать, что описанное явление связано с существованием точечных разрывов в молекулах РНК, выделенных из деструктивно измененных тканей. Эти нарушения в молекулах биополимера, по-видимому, стабилизируются за счет водородных связей или мостиков металлов и не выявляются без предварительной обработки.

В следующей серии экспериментов изучалась зависимость количества скрытых разрывов в рРНК от времени и температуры хранения животных после смерти. В препаратах рРНК, выделенных из мышцы животных, хранившихся в течение 3 сут после смерти при 0 или 10°C, не было выявлено скрытых разрывов при температурной обработке образцов (см. рис. 2, а, б). Как видно из рис. 2, в, увеличение температуры хранения до 15—17°C вызывало увеличение количества сравнительно низкомолекулярного материала, образующегося после прогрева образцов. Дальнейшее повышение температуры до 18—20° и 20—22°C вызывало заметное нарастание количества фрагментов в препаратах рРНК, выявляемых с помощью температурной обработки (см. рис. 2, г, д).

Проведенное исследование зависимости количества разрывов от срока посмертной деградации ткани показало, что с увеличением времени автолиза увеличивается переход высокомолекулярного материала из области 28S и 18S в более низкомолекулярную область (18S—5S), сопровождающийся заметным образованием фрагментов (см. рис. 3). Эти результаты были получены как при прогревании образцов, так и при их обработке формамидом. Интересно отметить, что в срок до 2 сут после смерти не происходило заметного увеличения количества разрывов в рРНК по сравнению с контролем. Возможно, это связано с развитием в данный период трупного окончания в мышечной ткани, сопровождающегося замедлением автолитических процессов [2].

Суммируя описанные выше результаты, можно сделать заключение, что в процессе автолиза происходит заметное увеличение скрытых разрывов в препаратах рРНК. Эти точечные разрывы могут образовываться и накапливаться или в тканях животного во время хранения трупов, или во время выделения препаратов РНК за счет большей активности РНК-аз в автолизированной ткани, чем в нормальной [1, 11]. Для проверки последнего предположения в процессе выделения РНК был использован ряд ингибиторов РНК-аз (макалоид, декстран-сульфат, поливинил-сульфат). Однако ни один из этих ингибиторов не уменьшил количества разрывов в выделенных образцах рРНК. Кроме того, выделенные в аналогичных условиях препараты

рРНК из печени и селезенки, тканей со значительно более высокой активностью РНК-аз, чем мышцы [12], давали после инкубации при 70°C в течение 1 мин распределение в градиенте плотности сахарозы, сходное с распределением рРНК из мышц. Эти данные позволяют считать более вероятным предположение о возникновении разрывов в молекуле нуклеиновой кислоты в процессе хранения материала. Появление некоторого количества фрагментированных молекул рРНК в норме и при патологических состояниях ткани было описано в литературе [4, 13] и может рассматриваться как промежуточный продукт при деградации РНК [13]. В связи с этим является вполне вероятным предположение о возможности мягкого нуклеазного гидролиза рРНК в процессе посмертной деградации тканей, приводящего к возникновению скрытых разрывов в молекуле нуклеиновой кислоты. Вопрос о локализации этой нуклеазной активности требует дальнейшей разработки.

Проведенное гистохимическое исследование РНК в мышечной ткани, подтвердившее хорошую сохранность этой нуклеиновой кислоты в процессе посмертной деструкции ткани, согласуется с результатами работы [14], в которой показана хорошая сохранность высокомолекулярной РНК при хранении почки в течение 2 дней, а также с ранее полученными нами данными [15] о незначительном распаде полисом в автолизированной ткани. Поскольку биохимические процессы, происходящие в тканях при ишемии, в достаточной степени близки к автолитическим процессам, сохранность полисом и рибосом в клетках миокарда в анаэробных условиях [16] также можно считать косвенным подтверждением сделанных нами выводов о незначительном изменении РНК в процессе автолиза. Однако при гистохимическом исследовании содержания РНК в автолизированной мышечной ткани уже через 36 ч после смерти животного РНК в миокарде и мышце не определялась [17]. Причина несоответствия этих результатов нашим данным в настоящий момент неясна. Можно предполагать, что значительно большая деградация РНК связана с иным температурным режимом хранения трупов, приводящим к образованию большего количества скрытых разрывов в молекуле нуклеиновой кислоты. Последующее воздействие формалина на такую РНК может приводить к ее фрагментации [18] и, возможно, вымыванию фрагментированной нуклеиновой кислоты в процессе обработки срезов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шишкин С. С., Никитина З. К. — «Вопр. мед. химии», 1977, т. 23, с. 346. — 2. Лушников Е. Ф., Шапиро Н. А. Аутолиз. Морфология и механизмы развития. М., 1974. — 3. Applebaum S. W., Ebstein R. P., Wyatt G. P. — «J. molec. Biol.», 1966, v. 21, p. 29. — 4. Руссев Г., Тсанев Р. — «Докл. Бълг. АН», 1975, т. 28, с. 807. — 5. Ishikawa H. — «Nucl. Acids. Res.», 1975, v. 2, p. 87. — 6. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., 1969, с. 145. — 7. Пирс Э. Гистохимия. М., 1962. — 8. Petermann M. L., Pavlovsk A. — «J. biol. Chem.», 1963, v. 43, p. 110. — 9. Спирин А. С., Гаврилова Л. И. Рибосома. М., 1968. — 10. Stanley W. M., Bock R. M. — «Biochemistry (Wash.)», 1965, v. 4, p. 1302. — 11. Holtzer R. L., Wan Lancker J. L. — «Am. J. Path.», 1962, v. 40, p. 331. — 12. Briskey E. J., Casseus R. G., Trautman J. C. (Eds) The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food. London, 1966. — 13. Tadashi I., Masamishi T., Yasukiyo U. et al. — «Arg. and biol. Chem.», 1974, v. 38, p. 2457. — 14. Lazarus H. M. — «Exp. molec. Path.», 1974, v. 21, p. 115. — 15. Шишкин С. С., Китавцев Б. А., Дебов С. С. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 1053. — 16. Jefferson L. S., Wolpert E. B., Giger E. E. et al. — «J. biol. Chem.», 1971, v. 246, p. 2171. — 17. Жаров В. В., Мирошник Г. М. — «Суд.-мед. эксперт.», 1975, № 2, с. 29. — 18. Spenser M. E., Walker I. O. — «Europ. J. Biochem.», 1971, v. 19, p. 451.

DEGRADATION OF RIBOSOMAL RNA IN RAT SKELETAL MUSCLE DURING AUTOLYSIS

Z. K. Nikitina, S. S. Shishkin, S. V. Tomashevich, S. S. Debov

Research Laboratory, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Comparative histochemical study of RNA content in normal and autolyzed within 72 hrs muscle tissue showed that the nucleic acid well retained during autolysis but the tissue was simultaneously destructed. Polymerization of rRNA in autolyzed tissue proved to depend on temperature of dead animals storage. An increase of temperature from 0° to 21° did not affect the rRNA yield. But amount of latent breaks, which were found in rRNA by methods of formamide and temperature treatment, was increased depending on increase in temperature and on length of animal storage after death. The latent breaks appear to be accumulated in animal tissues during autolysis.

УДК 612.751.1:547.962.9]-06:612.015.612

В. А. Исаева, В. Б. Спиричев

ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ α -, β - И γ -ЦЕПЕЙ РАСТВОРИМЫХ ФРАКЦИЙ КОЛЛАГЕНА КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВИТАМИНОМ D

Лаборатория биохимии и физиологии витаминов Института питания АМН СССР, Москва

Недостаточность витамина D вызывает снижение содержания соле-и кислоторастворимого коллагена и увеличение нерастворимого коллагена в эпифизах трубчатых костей крыс. При этом наблюдается снижение относительного содержания мономерных α -цепей и увеличение содержания димерных (β -цепей) и тримерных (γ -цепей) субъединиц в обеих фракциях коллагена. Полученные данные согласуются с предположением об усилении созревания костного коллагена при недостаточности витамина D.

Основным патоморфологическим проявлением недостаточности витамина D является нарушение минерализации костной ткани. Однако убедительные данные о непосредственном участии витамина D или его активных метаболитов в процессе кальцификации отсутствуют, и, по мнению большинства исследователей, нарушения минерализации при рахите обусловлены снижением концентрации кальция и фосфора в плазме крови вследствие замедления находящихся под контролем витамина D процессов всасывания этих ионов в тонком кишечнике и их мобилизации из предобразованной костной ткани [1—3].

Поддержание нормальной концентрации кальция и фосфора в плазме крови является лишь одним из факторов, влияющих на процессы кальцификации костной ткани. Другим не менее важным фактором является состояние органической матрицы, роль которой принадлежит коллагену [4—6]. В связи с этим изучение обмена и структуры коллагена костной ткани при различной обеспеченности витамином D представляет интерес для выяснения патогенеза нарушений минерализации при рахите и возможном влиянии витамина D на эти процессы.

Ранее нами [7] было показано, что недостаточность витамина D вызывает значительное (в 3—4 раза) снижение содержания соле- и кислоторастворимого коллагена в эпифизах и диафизах крыс при одновременном 3—4-кратном увеличении содержания альдегидных групп в этом коллагене и увеличении на 10—20 % содержания нерастворимого коллагена. Эти изменения наблюдаются уже на ранних стадиях D-гиповитаминоза, когда концентрация кальция и фосфора в сыворотке крови животных существенно не менялась. Введение 500 МЕ эргокальциферола животным, лишенным витамина D, вызывало полную нормализацию исследуемых показателей.

На основе этих данных было высказано предположение об ускорении процессов созревания коллагена костной ткани при недостаточности витамина D и возможной связи этого изменения с нарушением минерализации.

В созревании коллагена существенная роль принадлежит возникновению межцепевых поперечных связей между мономерными α -цепями, что ведет к образованию димеров α -цепей β -компонентов и тримеров γ -компонентов [8, 9]. В связи с этим можно предполагать, что если недостаточность витамина D действительно приводит к ускорению созревания коллагена, то это ускорение должно сопровождаться уменьшением относительного содержания α -цепей и увеличением содержания β - и γ -компонентов в растворимых фракциях коллагена. Исходя из этого, в настоящей работе было изучено относительное содержание α -цепей, β - и γ -компонентов молекул соле- и кислоторастворимого коллагена костной ткани крыс при различной обеспеченности витамином D методом электрофореза в полиакриламидном геле.

М е т о д и к а

Создание экспериментальной недостаточности витамина D. Исследование проводили на крысах отъемышах-самцах массой 40—50 г. Подопытные животные в течение 30—40 дней находились на искусственном рационе, лишенном витамина D, следующего состава (в процентах): казеин, отмытый от витамина D, — 22, крахмал — 40, глюкоза — 21,2, подсолнечное масло — 6, фильтровальная бумага — 3, смесь водорастворимых витаминов — 0,1 [10], цистин — 0,2, холина хлорид — 0,2, солевая смесь без кальция и фосфора — 2 [10], $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 3,2, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ — 2,1. Содержание кальция и фосфора в рационе с учетом их содержания в казеине составляло соответственно 0,6 и 1,2% (отношение кальций : фосфор 1 : 2). Витамин E к рациону не добавляли, так как он в достаточном количестве содержится в подсолнечном масле (50—70 мг%). Витамин A добавляли в подсолнечное масло в количестве 15 000 МЕ (5 мг) на 1 кг рациона в виде ретинола ацетата. Крыс содержали в помещении, лишенном солнечного света, по одному животному в клетке. Контрольные животные в дополнение к основному рациону получали в подсолнечном масле по 0,1 мл раствора эргокальциферола концентрации 240 МЕ в 1 мл 3 раза в неделю, что обеспечивает недельное потребление 72 МЕ или около 10 МЕ на крысу в день. Часть подопытных крыс в течение 3 дней до забоя получала по 500 МЕ эргокальциферола.

Оценка обеспеченности витамином D. Для оценки обеспеченности животных витамином D исследовали концентрацию кальция [11] и фосфора [12] в сыворотке крови, а также способность изолированного отрезка тонкого кишечника к всасыванию кальция против концентрационного градиента, которую выражали в виде отношения концентрации ^{45}Ca внутри вывернутого отрезка тонкой кишки к его концентрации в среде после инкубации в течение 90 мин ($Ca_v : Ca_d$) [13]. Фракции солерастворимого, кислоторастворимого и нерастворимого коллагена извлекали из эпифизов (вместе с метафизами) и диафизов трубчатых костей по методу Глимчера [14]. Содержание оксипролина во фракциях коллагена определяли после кислотного гидролиза спектрофотометрически с п-диметиламинобензальдегидом [15]. Фракции соле- и кислоторастворимого коллагена очищали путем многократных переосаждений с диализом и лиофилизировали [16, 17]. Относительное содержание α -, β - и γ -компонентов в очищенных фракциях соле- и кислоторастворимого коллагена исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [18]. Денситометрию гелей проводили на интегрирующем денситометре «Хромоскан-МК 11» фирмы «Joусе — Loeb1».

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, нахождение на рационе, лишенном витамина D, при соотношении в нем кальция и фосфора, равном 1 : 2, приводило к замедлению роста животных. К концу опыта вес крыс, лишенных витамина D, составлял 93 ± 4 г, а соответствующих контрольных крыс, получавших в дополнение к рациону физиологические дозы эргокальциферола, — 111 ± 5 г ($P < 0,02$).

Недостаточность витамина D приводила к снижению содержания кальция в сыворотке крови по сравнению с таковой в контроле (см. табл. 1).

У животных с недостаточностью витамина D наблюдалось также снижение способности тонкого кишечника к активному транспорту кальция против концентрационного градиента *in vitro* почти в 2 раза по сравнению с контрольными крысами (см. табл. 1).

Таким образом, пребывание крыс в течение 5 нед на рационе, лишенном витамина D, но полноценном по всем остальным показателям, приводит к развитию экспериментального D-авитаминоза.

Введение подопытным животным лечебных доз эргокальциферола в течение 3 дней до забоя нормализовало концентрацию кальция в сыворотке крови и способность тонкого кишечника к активному транспорту его.

Данные о содержании коллагена и его фракций в эпифизах костей крыс при различной обеспеченности витамином D представлены в табл. 2,

Т а б л и ц а 1

Обеспеченность подопытных животных витамином D ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных		
	контрольная (16)	—D (20)	—D+D (13)
Вес крыс при забое, г <i>P</i>	111±5	93±4 <0,02	100±5
Содержание кальция в сыворотке, мг% <i>P</i>	10,6±0,1	7,0±0,2 <0,001	10,8±0,15
Содержание фосфора в сыворотке, мг% <i>P</i>	8,0±0,33	13±0,24 <0,001	10,0±0,25
Всасывание ⁴⁵ Са в тонком кишечнике (Са _в : Са _п) <i>P</i>	2,7±0,3 (7)	1,4±0,1 (8) <0,002	3,1±0,4 (6)

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: в скобках — число животных в группе; —D — группа животных, находящихся на рационе, лишенном витамина D; —D+D — группа животных, находящихся на рационе, лишенном витамина D, но которым в течение последних 3 дней до забоя вводили по 500 МЕ эргокальциферола в день. *P* — достоверно по сравнению с контролем.

Т а б л и ц а 2

Содержание коллагена и его фракций в эпифизах костей крыс при различной обеспеченности витамином D, мкг оксипролина на 100 мг сухой недекальцинированной кости ($M \pm m$)

Группа животных	Содержание коллагена			
	солераствори- мого	кислотораствори- мого	нерастворимого	суммарного
Контрольная (16)	68±11	5,3±0,48	1720±35	1793±36
—D (20)	27±5	2,6±0,07	2094±10	2124±11
<i>P</i>	<0,002	<0,001	<0,001	<0,001
—D+D (16)	72±8	5,5±0,5	1915±45	1993±46
<i>P</i> ₁	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01

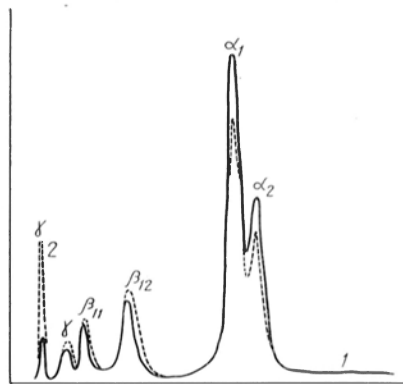
П р и м е ч а н и е. *P* — статистически достоверно по сравнению с контролем; *P*₁ — статистически достоверно по сравнению с группой —D.

из которой видно, что недостаточность витамина D вызывает в костной ткани существенные изменения содержания коллагена и его фракционного состава. Они выражаются прежде всего в увеличении суммарного содержания коллагена в эпифизах растущих крыс, находящихся на рационе, лишенном витамина D, по сравнению с контролем. Еще более выраженные изменения выявляются при анализе фракционного состава коллагена. Эти изменения характеризуются значительным (в 2—2¹/₂ раза) уменьшением содержания соле- и кислоторастворимого коллагена при одновременном накоплении метаболически более зрелого нерастворимого коллагена. Введение лечебных доз эргокальциферола способствовало восстановлению содержания солерастворимого и кислоторастворимого коллагена эпифизов костей крыс до такового у контрольных животных.

Изменения фракционного состава костного коллагена при недостаточности витамина D, выявленные в данном опыте, сходны с описанными нами ранее [7]. Отличие между этими опытами состоит в том, что в предыдущем

эксперименте животные находились на рационе с соотношением кальция и фосфора, равном 1 : 1, при котором концентрация кальция в плазме крови, несмотря на недостаточность витамина D, существенно не снижается. В настоящем опыте животные находились на рационе с соотношением кальция и фосфора, равном 1 : 2, при котором концентрация кальция в крови животных, лишенных витамина D, существенно снижалась. То обстоятельство, что состав коллагена изменяется при недостаточности витамина D одинаковым образом как в условиях гипокальцемии, так и при сохранении нормальной концентрации кальция в плазме крови, свидетельствует, что эти изменения обусловлены недостаточностью витамина D, а не опосредованы изменением уровня кальция в крови.

Результаты исследования содержания α -, β - и γ -компонентов в соле- и кислоторастворимом коллагене крыс при различной обеспеченности витамином D представлены на рисунке и в табл. 3. На рисунке приведена денситограмма очищенного солерастворимого костного коллагена эпифизов после электрофореза в полиакриламидном геле (100 мкг белка на гель).



Денситограммы α -, β - и γ -компонентов солерастворимого костного коллагена крысы, разделенных при помощи электрофореза в полиакриламидном геле.
1 — контроль; 2 — D-авитаминоз.

В табл. 3 представлено относительное содержание отдельных субъединиц соле- и кислоторастворимого костного коллагена. Как видно, основная часть (72,5 %) солерастворимого коллагена у контрольных животных приходилась на долю мономерных α -цепей, относительное содержание димеров (β -цепей) составляло 20,5 %, а тримеров (γ -цепей) — 7 %. Присутствие β - и γ -компонентов в исследуемой нами фракции солерастворимого коллагена обусловлено тем, что для ее извлечения был использован солевой раствор

Т а б л и ц а 3

Соотношение α -цепей, β - и γ -компонентов в костном коллагене эпифизов крыс, % суммы α -, β - и γ -компонентов ($M \pm m$)

Коллаген	Компонент	Группа животных	
		контрольная	- D
Солерастворимый	α	72,5 \pm 0,8	59,2 \pm 1
	β	20,5 \pm 0,3	26,5 \pm 1,1
	γ	7,0 \pm 0,7	14,3 \pm 0,8
Кислоторастворимый	α	52,9 \pm 0,64	41,0 \pm 1,2
	β	19,7 \pm 0,53	26,0 \pm 2
	γ	27,4 \pm 0,25	33,0 \pm 1,4

П р и м е ч а н и е. Приведены средние величины 4 параллельных определений, выполненных на объединенных фракциях, полученных от 16 животных

высокой ионной силы (1 M NaCl). В кислоторастворимой фракции на долю α -цепей приходилось около 50 % всего коллагена, а относительное содержание γ -компонентов (27,4 %) превышало содержание димеров.

Недостаточность витамина D приводила к значительному уменьшению относительного содержания α -цепей и одновременному увеличению содержания димеров (β -цепей) и тримеров (γ -цепей) в обеих фракциях.

Эти данные, демонстрирующие увеличение относительного содержания поперечносшитых β - и γ -субъединиц при одновременном снижении содержания мономерных α -цепей, подтверждают высказанное нами ранее предположение [7], что изменение фракционного состава костного коллагена при

недостаточности витамина D может быть обусловлено усилением процессов его созревания. В такой интерпретации эти результаты согласуются с данными других авторов [19] об увеличении в костной ткани D-авитаминозных цыплят активности лизилоксидазы — фермента, катализирующего окисление ϵ -аминогрупп лизильных и оксизильных остатков в молекуле коллагена с образованием альдегидных групп, принимающих участие в образовании поперечных сшивок [20]. С этой точкой зрения согласуются также наши данные об увеличении концентрации альдегидных групп в солерастворимом коллагене эпифизов крыс при недостаточности витамина D.

Увеличение скорости созревания и изменение фракционного состава костного коллагена при недостаточности витамина D могут являться наряду со снижением концентрации кальция в крови одной из причин нарушений минерализации костной ткани в этих условиях. Это предположение согласуется с данными литературы [21], показывающими, что включение меченого ^{45}Ca происходит в первую очередь во фракцию незрелого солерастворимого коллагена. Снижение содержания этой фракции при недостаточности витамина D может служить одной из причин нарушения кальцификации.

С другой стороны, ускорение созревания коллагена при недостаточности витамина D может быть и компенсаторной реакцией в ответ на нарушение минерализации, направленной на поддержание прочности костной ткани путем усиления фибриллогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Omdahl J. L., De Luca H. F. — «Physiol. Rev.», 1973, v. 53, p. 327—372. — 2. Reynolds J. J. — «Biochem. Soc. Spec. Publ.», 1974, № 3, p. 91—112. — 3. De Luca H. F. — «Ann. intern. Med.», 1967, v. 85, p. 367—377. — 4. Glimcher M. J. — In: Calcification in Biological Systems. Washington, 1960, p. 421. — 5. Howell D. S. — «J. Bone Jt. Surg.», 1971, v. 53-A, p. 250—258. — 6. Bachra B. N. — «Int. Rev. Connective Tissue Res.», 1970, v. 5, p. 165—208. — 7. Исаева В. А., Базанов Е. А., Спиричев В. Б. — «Вопр. питания», 1974, № 1, с. 45. — 8. Bailey A. J., Robins S. P. — «Sci. Progr.», 1976, v. 63, p. 419—444. — 9. Мазуров В. И. Биохимия коллагеновых белков. М., 1974. — 10. Suda T., De Luca F. H., Tanaka I. — «J. Nutr.», 1970, v. 100, p. 1049. — 11. Вичев Е. П., Карakashov A. B. — «Вопр. мед. химии», 1960, № 4, с. 435. — 12. King E. J. — «Biochem. J.», 1932, v. 26, p. 292—299. — 13. Martin D. L., De Luca H. F. — «Am. J. Physiol.», 1969, v. 216, p. 13151. — 14. Glimcher M. J., Katz E. P. — «J. Ultrastruct. Res.», 1965, v. 12, p. 705—729. — 15. Bergman I., Loxley B. — «Analyt. Chem.», 1963, v. 35, p. 1961. — 16. Miller E. M. et al. — «J. biol. Chem.», 1967, v. 242, p. 5481—5489. — 17. Piez K. A. et al. — «Biochemistry (Wash.)», 1963, v. 2, p. 58—66. — 18. Furtmayr H., Timpl R. — «Analyt. Biochem.», 1971, v. 41, p. 510. — 19. Gonnerman W. A., Toverud et al. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)», 1976, v. 151, p. 453—456. — 20. Siegel R. C., Martin G. R. — «J. biol. Chem.», 1970, v. 245, p. 1653. — 21. Uitto J., Laitinen O. — «Acta chem. scand.», 1968, v. 22, p. 1039.

Поступила 7/VI 1977 г.

RELATIVE CONTENT OF α , β AND γ -CHAINS OF SOLUBLE COLLAGEN FRACTIONS IN BONE TISSUE UNDER VARIOUS SUFFICIENCY OF VITAMIN D

V. A. Isaeva, V. B. Spirichev

Laboratory of Biochemistry and Physiology of Vitamins, Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Insufficiency of vitamin D caused a decrease in content of salt- and acid soluble collagen fractions with simultaneous increase of insoluble its fraction in epiphyses of rat tubular bones. At the same time relative content of monomeric α -chains was decreased but content of dimeric (β -chains) and trimeric (γ -chains) subunits was increased in both collagen fractions. These data are in good agreement with assumption on the increased growth of bone collagen under insufficiency of vitamin D.

Ф. З. Меерсон, М. П. Явич, Г. Г. Горач

МЕТАБОЛИЗМ ПОЛИ-А⁺-СОДЕРЖАЩЕЙ иРНК МИОКАРДА В НОРМЕ И ПРИ КОМПЕНСАТОРНОЙ ГИПЕРФУНКЦИИ СЕРДЦА

Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Методом иффинной хроматографии на поли-У-целлюлозе в сердечной мышце крысы обнаружены 2 фракции иРНК: поли-А⁺ и поли-А⁻ иРНК. Эти фракции составляют 30 и 70% всей иРНК соответственно. Соотношение поли-А⁺/поли-А⁻ иРНК в миокарде не меняется при гиперфункции сердца и его физиологическом старении. Продолжительность жизни поли-А⁺ иРНК сердца в норме составляет 4 ч. При гиперфункции миокарда в начале развития этого процесса продолжительность жизни иРНК сокращается до 2—3 ч, при длительной гипертрофии сердца (6 мес) продолжительность жизни иРНК не отличается от контроля. Скорость синтеза поли-А⁺ иРНК повышается на ранней стадии гиперфункции сердца на 70% по сравнению с нормой и падает ниже нормы в длительно гипертрофированном миокарде. Ускорение синтеза поли-А⁺ иРНК при создании его гиперфункции выражено в большей степени, чем увеличение синтеза рРНК.

Обнаружение в иРНК эукариотов на 3' конце молекулы нетранслируемых поли-А-последовательностей позволило разделить иРНК от основной массы РНК клетки и разработать прямые подходы к изучению ее метаболизма [1]. Благодаря этому приему в ряде тканей удалось измерить скорость синтеза и распада иРНК и определить продолжительность ее жизни [2, 3].

Поли-А-сегмент на конце иРНК обнаружен в мышечных клетках — в миоблестах их скелетных мышц, в скелетных мышцах куриного эмбриона [4—6]. Из тотальной популяции иРНК миобластов выделены блоки поли-А, содержащие 120—140 нуклеотидов [5]. Показано, что поли-А⁺ иРНК миобластов гетерогенна по своей метаболической стабильности. 75 % этой фракции, в том числе предполагаемая иРНК миозина (26S), имеют продолжительность жизни около 10 ч. Кроме того, существуют более короткоживущие иРНК (менее 6 ч) и долгоживущие (около 20—25 ч). При терминальной дифференцировке миобластов в период интенсивного синтеза миозина и специфических ферментов продолжительность жизни указанных классов иРНК увеличивается [7]. Поли-А-последовательности открыты также в иРНК, направляющих синтез актина и миозина в бесклеточной системе белкового синтеза [6, 8, 9]. Установлено, что иРНК, способная синтезировать тяжелые цепи миозина, содержит блок поли-А, состоящий из 170 нуклеотидов [8].

В сердечной мышце, а также в скелетных мышцах содержание поли-А⁺-фракции иРНК, скорость ее синтеза и распада не исследованы. Цель настоящей работы — выяснить относительное содержание поли-А⁺- и поли-А⁻-фракции иРНК в сердце, а также продолжительность жизни молекул поли-А⁺ иРНК в норме и при развитии компенсаторной гиперфункции сердца (КГС).

Методика

Животные. Опыты были поставлены на белых крысах-самцах. КГС создавали путем коарктации брюшной аорты по ранее описанной методике [10]. Контрольной группой животных служили молодые крысы (3—4 мес) массой 200—220 г, а в других опытах — старые (22—24 мес) массой 450—500 г. Животные с КГС были представлены 2 группами: 1-я группа — ранняя стадия гиперфункции (48 ч после создания стеноза аорты), крысы массой 200—220 г в возрасте 3—4 мес; 2-я группа — поздняя стадия гиперфункции (6—7 мес после коарктации аорты), крысы массой 370—390 г в возрасте 6—6½ мес.

Реактивы и изотопы KCl, MgCl₂, NaCl, сахароза (СССР), трис-HCl (фирма NBC, Англия), тритон X-100 (фирма «Merk», Англия), диоксан (сцинтилляционный), толуол (сцинтилляционный), хлороформ, фенол, этиловый спирт, ППО, ПОПОП (СССР), ЭДТА, актиномицин D (фирмы «Reanal», Венгрия), додецилсульфат натрия (ЛДС-Na), поли-А,

поли-У (фирма «Calbiochem», США), целлюлоза (фирмы «Reanal», Венгрия), ионообменная смола дауэкс-50 Н⁺ (фирма «Serva», ФРГ), пластинки «Silufol» для тонкослойной хроматографии (фирма «Kavalier» ЧССР).

Введение ¹⁴С-оротовой кислоты. В качестве меченого предшественника РНК животным внутрибрюшинно вводили ¹⁴С-оротовую кислоту из расчета 50 мкКи на 100 г массы.

Выделение рибосом сердечной мышцы. Рибосомы сердца выделяли по ранее описанному методу [11]. Сердца гомогенизировали в 5-кратном объеме буфера I (0,250 М КСl, 0,010 М MgCl₂, 0,010 М трис-НСl, рН 7,6) в гомогенизаторе типа Поттера с тефлоновым пестиком. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 15 000 g. Постмитохондриальный экстракт инкубировали 15 мин в ледяной бане с 1% тритоном X-100, разводили в 5 раз буфером II (0,01 М MgCl₂, 0,01 М трис-НСl рН 7,6) и центрифугировали 30 мин при 105 000 g. В результате снижения ионной силы раствора и последующего центрифугирования рибосомы, смешанные с миофибриллами, выпадают в осадок; выход составляет 0,9—1,0 мг на 1 г влажной ткани. Выделение рибосом проводили при 4°C, растворы готовили на деионизованной воде.

Выделение полирибосом. Рибосомы, полученные в буфере с высокой ионной силой, содержат большое количество белка (1 мг РНК на 3 мг белка). Нам удалось очистить рибосомы от примесей миофибрилярного белка в ступенчатом градиенте концентрации сахарозы. Для этого обработанный тритоном X-100 постмитохондриальный экстракт, полученный вышеописанным способом, насливали на ступенчатый градиент концентрации 1 М и 2 М сахарозы (7 мл и 7 мл), приготовленный на буфере I. Полирибосомы осаждали в течение 2 1/2 ч при 300 000 g и 4°C в титановом роторе (Ti 60) на ультрацентрифуге «Spinco L-2-65 В». Осадки полирибосом споласкивали буфером I, замораживали в жидком азоте и хранили при -20°C. Сочетая буфер высокой ионной силы, предложенный Хейвудом и Ричем для извлечения основной массы рибосом мышечной ткани [12], с последующей их очисткой в ступенчатом градиенте сахарозы, нам удалось получить чистые препараты полирибосом ($A_{260}/A_{280} = 1,85$, $A_{260}/A_{235} = 1,6$) с относительно высоким выходом — 0,4—0,5 мг полирибосом на 1 г влажной ткани.

Определение количества РНК. Содержание РНК в рибосомах определяли спектрофотометрически по Спирину [13].

Приготовление поли-У-целлюлозы. Очистку целлюлозы и ее сшивку с поли-У проводили по методу Шелдона и соавт. [14]. Емкость поли-У-целлюлозы определяли по препарату поли-А и выражали в оптических единицах поли-А, связывающихся с 1 г поли-У-целлюлозы. Были использованы препараты поли-У-целлюлозы емкостью 10—12 ОЕ.

Фракционирование РНК на колонке с поли-У-целлюлозой. Осадки рибосом растворяли в буфере, содержащем 0,250 М NaCl и 0,010 М трис-НСl рН 7,4. Затем добавляли ЭДТА до конечной концентрации 0,02 М и ДДС-На до конечной концентрации 0,5—1%. Смесь инкубировали 1 мин при 37°C и разбавляли 0,01 М трис-НСl-буфером рН 7,6 до конечных концентраций 0,125 М NaCl, 0,01 М трис-НСl, 0,01 М ЭДТА, 0,25% ДДС-На и 0,25—0,5 мг/мл исходных рибосом. Полученную смесь пропускали через колонку. Материал, сорбированный на целлюлозе, элюировали 0,01 М трис-НСl-буфером рН 9,1 при 37°C. Радиоактивность фракций поли-А⁺ РНК и поли-А⁻ иРНК выражали числом распадов в 1 мин на 1 мг полирибосом.

Седиментационный анализ РНК. Материал, сорбированный и несорбированный на колонке с поли-У-целлюлозой, анализировали в градиенте плотности сахарозы (15—30%), приготовленной на буфере, содержащем 0,1 М NaCl, 0,01 М трис-НСl рН 7,6, 0,02 М ЭДТА и 0,5% ДДС-На. Фракцию поли-А⁻ РНК предварительно депротеинизировали с помощью фенола и хлороформа. К фракции поли-А⁺ иРНК добавляли в качестве носителя немеченую тотальную РНК сердца, выделенную методом фенольно-хлороформной депротеинизации. РНК насливали на градиент сахарозы и центрифугировали 18 ч в роторе SW-27.1 при 113 000 g на «Spinco L-65 В» при 22°C. Градиент раскапывали на фракции и в каждой фракции просчитывали поглощение при A_{260} и радиоактивность.

Приготовление кислоторастворимой фракции сердечной мышцы. Для получения кислоторастворимой фракции сердца измельченные ножницами ткани замораживали в жидком азоте и растирали в ступках стеклянным пестиком. Растертую массу переносили в пробирки, помещали в ледяную баню, добавляли 1,5—2 мл трис-НСl-буфера рН 7,6 и размешивали. К гомогенату добавляли равный объем 1 н. HClO₄ и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Надосадочная жидкость представляла собой кислоторастворимую фракцию, содержащую меченые производные ¹⁴С-оротовой кислоты. Эту фракцию нейтрализовали на холоду 1 н. КОН до рН 7,0 и центрифугировали. К надосадочной жидкости добавляли HCl до конечной концентрации 0,65 н. и наносили ее на колонку с ионообменной смолой Дауэкс-50 в Н⁺-форме. Фильтрат собирали фракциями по 1 мл. В каждой фракции просчитывали радиоактивность и определяли спектр поглощения в области 220—320 нм на спектрофотометре «Uniscan». Анализируя фракции таким образом, установили, что наибольшее количество меченых УМФ, УДФ и УТФ находятся в 6—7-й фракциях, вытекающих с колонки. В дальнейшем эти фракции объединяли и их радиоактивность рассчитывали на 1 ед. опт. пл. при A_{260} . Хроматографический анализ 6-й и 7-й фракций на тонкослойных пластинках «Silufol» в системе бутанол — уксусная кислота — ацетон — вода показал, что основное количество метки связано с пятном УТФ. Радиоактивность пула определяли в интервале 0,5—10 ч после введения животным ¹⁴С-оротовой кислоты.

Измерение радиоактивности проводили в сцинтилляционной жидкости Брея [15] на сцинтилляционном счетчике «Mark II» фирмы «Nuclear Chicago» (США).

Введение актиномицина D. Актиномицин D вводили животным внутривенно за час до введения изотопа. Дозы антибиотика, ингибирующие синтез рРНК и не влияющие на синтез иРНК, подбирали экспериментально. С этой целью актиномицин D вводили животным в широком диапазоне доз. Через 6 ч после его введения крыс забивали, определяли удельную радиоактивность рибосом сердца и строили график дозовой зависимости синтеза рРНК от количества актиномицина D. В результате было установлено, что для подавления синтеза рРНК в миокарде молодых крыс весом 200—220 г требуется 250 мкг актиномицина D, старых крыс весом 450—500 г — 400 мкг актиномицина D и крыс весом 370 г — около 320 мкг актиномицина.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы исследовать соотношение поли-А⁺/поли-А⁻-фракций иРНК в сердце, мы применили актиномицин D в дозах, ингибирующих синтез рРНК и не влияющих на синтез иРНК. Дозы актиномицина подбирали для каждой группы животных отдельно, как это указано в разделе «Методика». Зависимость включения ¹⁴С-оротовой кислоты в рибосомы сердца молодых крыс от различных количеств актиномицина D показано на рис. 1.

Соотношение фракций поли-А⁺/поли-А⁻ иРНК исследовали че-

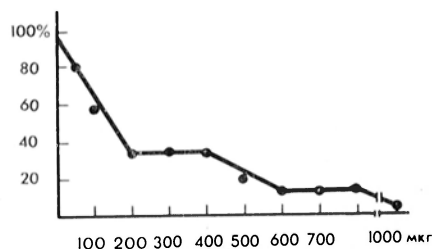


Рис. 1. Включение ¹⁴С-оротовой кислоты в рибосомы сердца в зависимости от дозы актиномицина D (крысы массой 200—220 г).

По оси абсцисс — дозы актиномицина D (в мкг); по оси ординат — % включения ¹⁴С-оротовой кислоты в рибосомы.

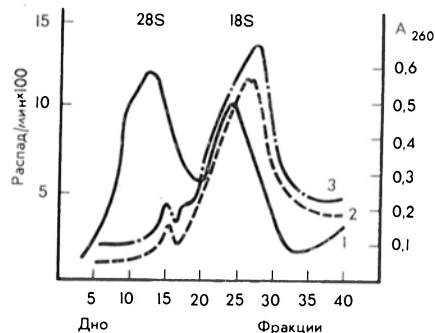


Рис. 2. Седиментационное распределение фракций РНК, сорбированной и несорбированной («проскок») на полиУ-целлюлозе в градиенте плотности сахарозы.

По оси абсцисс — номера фракций; по оси ординат: 1 — поглощение при 260 нм; 2 — радиоактивность поли-А⁺ иРНК; 3 — радиоактивность поли-А⁻ иРНК («проскок»). Животным через 1 ч после введения актиномицина D была введена ¹⁴С-оротовая кислота. Постмитохондриальный экстракт сердца направили на градиент плотности сахарозы (15—30%), приготовленный на буфере, содержащем 0,1 М NaCl, 0,01 М трис-НСl, рН 7,6, 0,02 М ЭДТА и 0,5% ДДС- Na. Центрифугирование 18 ч при 113 000g и 22°C.

рез 2, 4 и 5 ч после ¹⁴С-оротовой кислоты. Результаты этих опытов представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, содержание поли-А⁺ иРНК в общей популяции иРНК сердца колеблется в пределах 27—33 % и в среднем составляет 30 %. Из полученных данных также следует, что отношение величин

Таблица 1
Соотношение фракций поли-А⁺ и РНК/поли-А⁻ и РНК в сердечной мышце крысы

Животные	Время после введения ¹⁴ С-оротовой кислоты, ч	Радиоактивность, нмп/мин		Поли-А ⁺ иРНК, % общей радиоактивности иРНК
		поли-А ⁺ иРНК	поли-А ⁻ иРНК	
Молодые крысы (3—4 мес)	2	3000	7 000	30
	4	2800	6 100	31
	5	3600	8 500	30
Старые крысы (23—24 мес)	5	3000	6 600	31
Молодые крысы (3—4 мес), гиперфункция сердца 48 ч	5	6900	14 000	33
Крысы в возрасте (9—10 мес), гиперфункция сердца 6 мес	5	4300	10 200	30
	5	2800	7 000	28,5
		3000	6 000	33

включения ^{14}C -оротовой кислоты в иРНК, содержащую поли-А и не содержащую поли-А, не зависит от времени экспозиции метки. Оно колеблется в одинаковых пределах через 2, 4 и 5 ч после введения изотопа. Это говорит о том, что обе фракции иРНК синтезируются с одинаковой скоростью и мало различаются по продолжительности жизни.

Для того чтобы определить, что метка в РНК, сорбированной на поли-У-целлюлозе и несорбированной, принадлежит действительно иРНК и не содержит примесей рРНК, весь материал был подвергнут седиментационному анализу в градиенте плотности сахарозы. Поли-А⁺ иРНК и поли-А⁻ иРНК исследовали отдельно. Полученные седиментограммы представлены на рис. 2. Из рис. 2

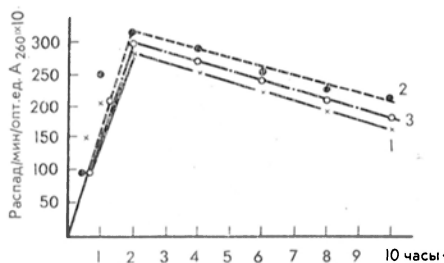


Рис. 3. Включение ^{14}C -оротовой кислоты в УТФ сердца.

По оси абсцисс — время (в ч); по оси ординат — радиоактивность УТФ (число распадов/мин/ед. опт. пл. при 260 им), 1 — контроль; 2 — гиперфункция 48 ч; 3 — гиперфункция 6 мес.

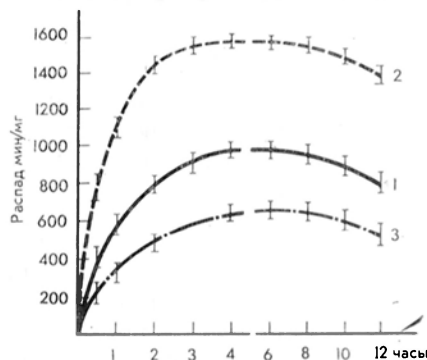


Рис. 4. Распад поли-А⁺ иРНК в сердечной мышце крысы.

По оси абсцисс — время (в ч), по оси ординат — радиоактивность поли-А⁺ иРНК (число распадов/мин/мг/полирибосом), 1 — контроль; 2 — гиперфункция 48 ч; 3 — гиперфункция 6 мес. Полирибосомы сердца диссоциированы в буфере, содержащем 0,125 М NaCl, 0,010 М трис-HCl pH 7,6, 0,02 М ЭДТА, 0,5—1% ДДС-Na и наложены на колонку с поли-У-целлюлозой.

видно, что в обеих фракциях метка распределяется в области 28—10 S с максимумом радиоактивности в области 16—14 S. Это совпадает с данными литературы о гетерогенности иРНК [2, 16]. В то же время интересно отметить небольшой пик радиоактивности в области 26—24 S. Подобный пик был обнаружен при исследовании иРНК миобластов и скелетных мышц куриного эмбриона. Предполагают, что это пик миозиновой иРНК [4, 9]. По-видимому, он характерен для мышечной ткани. Полученные седиментограммы свидетельствуют о том, что в описанных условиях метится только иРНК.

Соотношение поли-А⁺/поли-А⁻ иРНК было исследовано при гиперфункции сердца и его физиологическом старении. Установлено, что скорость синтеза РНК и белков в миокарде при его гиперфункции в начале развития этого процесса значительно возрастает [17, 18]. Наоборот, при длительной гиперфункции и гипертрофии сердца, а также при его физиологическом старении скорость образования РНК и белков падает [19]. Таким образом, соотношение поли-А⁺/поли-А⁻ иРНК исследовали при различных скоростях синтеза РНК и белков. Полученные данные представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, при гиперфункции сердца как на ранней, так и на поздней стадии этого процесса соотношение фракций иРНК поли-А⁺/поли-А⁻ не меняется и они соответственно составляют 30 и 70 %. Аналогичные результаты были получены при исследовании миокарда старых животных.

Следует иметь в виду, что на колонке с поли-У-целлюлозой сорбируются только большие блоки поли-А — свыше 40 нуклеотидов [20]. Соответственно фракция поли-А⁺ иРНК, представляющая 30 % тотальной популяции иРНК сердца, должна содержать относительно длинный сегмент поли-А.

В следующей части работы мы исследовали скорость распада и синтеза поли-А⁺ иРНК сердца в норме и при его гиперфункции. Предварительно была изучена кинетика поступления метки в УТФ пула сердца в норме и при гиперфункции. Эти данные представлены на рис. 3. Из полученных кривых видно, что характер накопления метки в УТФ сердца в норме и при гиперфункции один и тот же. Радиоактивность достигает своего максимума через 2 ч после введения изотопа, а затем снижается. В течение последующих 8 ч радиоактивность падает на 30 %. При этом уровень включения метки в УТФ сердца при гиперфункции не отличается от контрольного. Следовательно, скорость синтеза и распада предшественника РНК у всех исследованных групп животных не меняется и возможные различия в метаболизме иРНК при гиперфункции сердца будут объясняться только сдвигами в скоростях ее синтеза и распада.

Время жизни иРНК определяли по кинетике включения метки в иРНК через 1/2, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 ч после введения изотопа. Результаты этих опытов представлены на рис. 4. Как видно из полученных данных, в контрольном сердце радиоактивность иРНК достигает своего максимума через 4 ч после введения ¹⁴С-оротовой кислоты, а затем в течение последующих 4 ч сохраняется на постоянном уровне. Снижение радиоактивности иРНК через 10 ч, по-видимому, связано с падением количества меченого предшественника. При создании гиперфункции сердца (через 48 ч) характер включения ¹⁴С-оротовой кислоты в иРНК несколько изменен — выход кривой на плато наблюдается уже через 2—3 ч после поступления метки (см. рис. 4). Выход кривой на плато свидетельствует о том, что количество распавшихся молекул иРНК равно количеству вновь синтезированных. Следовательно, по характеру кривых можно судить об изменении времени жизни иРНК.

Таким образом, в норме продолжительность жизни основной массы поли-А⁺ иРНК в сердце составляет около 4 ч. При создании гиперфункции в начале развития этого процесса скорость распада иРНК повышается и период ее полураспада составляет 2—3 ч. В миокарде, длительно выполняющем КГС, время жизни молекул иРНК заметно не отличается от нормы и приближается к 4 ч.

Данные по включению ¹⁴С-оротовой кислоты в иРНК позволяют сравнить скорость поступления в цитоплазму поли-А⁺ фракции иРНК сердца в норме и при гиперфункции. Сопоставляя уровень радиоактивности иРНК на плато кривых (через 4—8 ч после введения метки), можно заключить, что в миокарде через 48 ч после создания гиперфункции эта величина на 70 % выше, чем в контроле. В сердце, длительно выполняющем КГС, поступление поли-А⁺ иРНК в цитоплазму по сравнению с нормой снижено.

Ранее было установлено, что синтез рРНК при гиперфункции миокарда также изменяется. Он усиливается в начале развития этого процесса и снижается при длительной КГС [17, 19]. В связи с этим представляло интерес выяснить соотношение скоростей синтеза иРНК и рРНК при гиперфункции сердца. Используемые нами методы позволили это сделать. При посадке диссоциированных полисом на колонку с поли-У-целлюлозой фракция РНК, не сорбированная на колонке («проскок»), содержит смесь рРНК и поли-А⁺ иРНК. Радиоактивность поли-А⁺ иРНК можно рассчитать. Она равна удвоенной радиоактивности поли-А⁺ иРНК, так как фракции поли-А⁺/поли-А⁺ иРНК в сердце соотносятся как 1 : 2. Таким образом, вычитая метку поли-А⁺ иРНК из общей радиоактивности «проскока», можно вычислить величину, характеризующую включение изотопа в рРНК. В табл. 2 представлены данные, характеризующие соотношение скоростей синтеза поли-А⁺ иРНК и рРНК сердца в норме и при гиперфункции. Из табл. 2 видно, что на ранней стадии гиперфункции миокарда синтез иРНК усиливается в большей степени, чем синтез рРНК. При длительной гипертрофии сердца скорости образования иРНК и рРНК снижаются в равной степени и соотношение их синтезов не отличается от контроля.

Полученные данные позволяют сделать ряд заключений.

В сердечной мышце взрослых крыс имеются 2 фракции иРНК — содержащая поли-А-сегмент (свыше 40 нуклеотидов) — поли-А⁺ иРНК и не содержащая поли-А — поли-А⁻ РНК. Поли-А⁺ иРНК составляет около 30 % тотальной популяции иРНК сердца. Интересно отметить, что подобное соотношение поли-А⁺/поли-А⁻ иРНК (30 и 70 %) обнаружено в тканях печени [21].

Функциональная роль поли-(А)-блоков на конце иРНК неизвестна. Возможно, они вовлекаются в процессирование и ядерно-цитоплазматический транспорт этих молекул, а также в связывание с рибосомами [11]. Имеются данные, что при переходе клеток из одного биологического состояния в дру-

Т а б л и ц а 2

Синтез иРНК и рРНК в миокарде в норме и при КГС

Животные	Время после введения ¹⁴ С-оротовой кислоты, ч	Радиоактивность полирибосом, распад/мин/мг		Соотношение рРНК/иРНК
		рРНК	иРНК	
Контроль	4	5 900	930	6.4
	6	6 800	920	7.4
Гиперфункция 48 ч	4	8 800	1 580	5.5
	6	10 000	1 600	6.6
Гиперфункция 6 мес.	4	3 900	620	6.3
	6	4 600	620	7.4

гое отношение поли-А⁺/поли-А⁻ фракций в популяции иРНК может закономерно меняться [2, 21]. В наших опытах соотношение поли-А⁺/поли-А⁻ фракций иРНК, обнаруженное в нормальном миокарде, сохранялось при возникновении и развитии КГС, а также при физиологическом старении животных, т. е. не зависело от уровня синтеза РНК и белков в сердце.

Согласно кинетике включения меченого предшественника в иРНК, средняя продолжительность жизни основной массы поли-А⁺ иРНК в миокарде составляет около 4 ч. Эти данные сопоставимы с величинами для иРНК скелетных мышц, полученными Хаек и Бурсовой [22]. По кинетике включения в иРНК ³H-уридина авторы установили, что период полураспада иРНК скелетных мышц составляет 2—3 ч.

В начале создания гиперфункции сердца скорость распада иРНК увеличивается и продолжительность ее жизни сокращается до 2—3 ч. Это, возможно, связано с появлением короткоживущих молекул иРНК, участвующих в синтезе регуляторных белков. Такие белки могут быть ответственны за активацию белкового синтеза в миокарде на раннем этапе КГС. При длительной КГС скорость распада иРНК не отличается от контрольной.

Интересно отметить, что скорость распада полирибосом сердца в условиях актиномицинового блока в начале возникновения гиперфункции также увеличивается по сравнению с контролем и не меняется при длительной гипертрофии миокарда [23]. Эти данные свидетельствуют о снижении метаболической стабильности компонентов белоксинтезирующей системы сердца на ранней стадии КГС.

В результате развития гиперфункции сердца скорость поступления поли-А⁺ иРНК в цитоплазму изменяется. Так, в начале создания КГС эта величина превышает контрольный уровень на 70 %, причем скорость синтеза иРНК увеличена в большей степени, чем скорость образования рРНК. Это коррелирует с обнаруженным нами ранее фактом увеличения при гиперфункции количества полирибосом в общей популяции рибосом сердца [11]. Об увеличенном образовании иРНК по отношению к рРНК при гиперфункции миокарда говорят также данные Шрайбера и соавт. [24].

При длительной гипертрофии миокарда скорость синтеза поли-А⁺ иРНК уменьшается по сравнению с нормой, хотя соотношение скоростей синтеза поли-А⁺ иРНК/рРНК не отличается от контроля. Снижение скорости синтеза при неизменной скорости распада должно вести к некоторому уменьшению концентрации иРНК. Это может являться одной из причин снижения скорости синтеза белка и нарушения обновления структур в миокарде, длительно выполняющем гиперфункцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brawerman G. — «*Progr. Nucl. Acid. Res. molec. Biol.*», 1976, v. 17, p. 118. —
2. Черновская Т. В., Любимова Е. В., Лерман М. И. — «*Молекулярная биол.*», 1976, т. 10, с. 1361. — 3. Ouellette A., Reed S., Malt R. — «*Proc. nat. Acad. Sci. USA*», 1976, v. 73, p. 2609. — 4. Buckingham M. E., Cohen A., Gross F. — «*J. molec. Biol.*», 1976, v. 103, p. 611. — 5. Kaufman S., Gross F. — «*Biochim. biophys. Acta*», 1974, v. 353, p. 133. — 6. Mondal H., Suttan A. et al. — «*Biochem. biophys. Res. Commun.*», 1974, v. 56, p. 988. — 7. Buckingham M. E., Carut D. et al. — «*Proc. nat. Acad. Sci. USA*», 1974, v. 71, p. 1466. — 8. Paterson B. M., Roberts R. E., Yaffe D. — *Ibid.*, 1974, v. 71, p. 4467. — 9. Morris G. E., Buzach E. et al. — «*Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*», 1973, v. 37, p. 535. — 10. Меерсон Ф. З., Лерман М. И., Явич М. П. — «*Вопр. мед. химии*», 1974, № 6, с. 588. — 11. Явич М. П., Лерман М. И., Меерсон Ф. З. — «*Биохимия*», 1976, т. 41, с. 12. — 12. Heywood S. M., Rich A. et al. — «*Biochemistry (Wash.)*», 1968, v. 7, p. 3289. — 13. Спиринов А. С. — «*Биохимия*», 1958, т. 23, с. 656. — 14. Sheldon R., Jurgale C. et al. — «*Proc. nat. Acad. Sci. USA*», 1971, v. 69, p. 417. — 15. Gray G. A. — «*Analyt. Biochem.*», 1960, v. 1, p. 279. — 16. Ouellette A., Kumar A., Malt R. — «*Biochim. biophys. Acta*», 1976, v. 425, p. 384. — 17. Меерсон Ф. З. Гиперфункция. Гипертрофия. Недостаточность сердца. М., 1968. — 18. Nair K. G., Guttillet A. J. et al. — «*Circulat. Res.*», 1968, v. 23, p. 451. — 19. Меерсон Ф. З., Явич М. П., Лерман М. И. — «*Вопр. мед. химии*», 1976, № 6, с. 753. — 20. Brzubyła A., Stronman R. C. — «*Proc. nat. Acad. Sci. USA*», 1974, v. 71, p. 662. — 21. Nemer M. — «*Cell*», 1975, v. 6, p. 559. — 22. Hajek J., Vingesova M. — «*Physiol. bohemoslov.*», 1973, v. 22, p. 623. — 23. Явич М. П., Лерман М. И., Меерсон Ф. З. — «*Вопр. мед. химии*», 1975, № 1, с. 13. — 24. Schreiber S., Oratz M. et al. — «*Clin. Res. Proc.*», 1968, v. 16, p. 248.

Поступила 1/IX 1977 г.

TURNOVER OF POLY A⁺ CONTAINING mRNA OF MYOCARDIUM IN NORMAL STATE AND IN HEART COMPENSATORY HYPERFUNCTION

F. Z. Meerson, M. P. Yavich, G. G. Gorach

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Two fractions of mRNA — polyA⁺ and polyA[−] containing mRNA — were found in rat heart muscle by affinity chromatography using polyU cellulose. These fractions constituted 30% and 70% of total mRNA, respectively. The ratio of polyA⁺/polyA[−] mRNA was not altered in myocardium under heart hyperfunction and in physiological ageing. Duration of life of polyA⁺ containing mRNA was 4 hrs in normal heart. At the beginning of myocardium hyperfunction the period of mRNA life was decreased down to 2-3 hrs; this pattern of mRNA life alteration did not differ from control one in prolonged heart hypertrophy within 6 months. The rate of polyA⁺ containing mRNA synthesis was increased by 70% at the early steps of heart hyperfunction as compared with normal state; it decreased below the normal state in long-term hypertrophy of myocardium. In development of heart hyperfunction acceleration of polyA⁺ containing mRNA synthesis was more distinct than an increase in rRNA synthesis.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616-008.931:577.152.271'164]-074

Г. Г. Шурда, Л. Е. Панин

ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ ИЗОФЕРМЕНТОВ ГЕКСОКИНАЗЫ В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ

Лаборатория биохимии Института клинической и экспериментальной медицины, Новосибирск

Предложена модификация метода определения изоферментов гексокиназы путем электрофореза в полиакриламидном геле. Иммобилизация глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в геле, использование в качестве катализатора полимеризации рибофлавина и стабилизация глюкозой позволяют создать лучшие условия для выявления гексокиназной активности. Метод прост, обладает высокой разрешающей способностью, является сравнительно быстрым и экономичным.

Разделение и определение активности изоферментов гексокиназы (ГК) основано на различиях в их физико-химических и иммунологических свойствах. Существует несколько методических подходов к определению изоферментного спектра ГК: хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе [1—4] и ДЭАЭ-сефадексе [5], электрофорез в крахмальном [6—13], агаровом [14, 15], полиакриламидном [20—28] гелях и на ацетат-целлюлозных мембранах [16—19], иммунохимический метод [30].

Все перечисленные методы дают неплохие результаты, однако они не лишены недостатков. Так, хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе позволяет успешно выделять 4 фракции ГК, но требует много времени для разделения и анализа большого числа образцов. Кроме того, этот метод связан с расходом больших количеств дорогостоящих реактивов. Электрофорез в крахмальном геле продолжается 16—18 ч, т. е. также требует много времени. Кроме того, крахмальный гель непрозрачен, что затрудняет количественную оценку активности отдельных фракций путем денситометрии. Иммунохимический метод определения изоферментов ГК связан с выделением и тщательной очисткой отдельных изоферментов, иммунизацией животных и получением антител. Для количественного определения изоферментов ГК требуется титрование соответствующими антисыворотками экстрактов тканей. Естественно, что этот трудоемкий метод малоприменим для клинических и биохимических лабораторий.

Для разделения изоферментов ГК и количественного определения их активности мы использовали электрофорез в полиакриламидном геле. Этот метод имеет ряд преимуществ. Он характеризуется высокой разрешающей способностью, сравнительно коротким временем разделения изоферментов и возможностью денситометрии фореграмм непосредственно в геле. К недостаткам данного метода следует отнести затруднение диффузии из среды инкубации в гель вспомогательного фермента — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), имеющего большой молекулярный вес, инактивацию персульфатом аммония глюкокиназной активности [27]. Скорость диффузии Г-6-ФДГ из инкубационной среды в матрикс геля лимитирует весь процесс выявления гексокиназной активности. Для преодоления этого недостатка Хард [23] и Харрисон [28] предложили использовать иммобилизацию Г-6-ФДГ непосредственно в полиакриламидном геле. Первый автор считает, что иммобилизация фермента осуществляется за счет большого молеку-

лярного веса Г-6-ФДГ. Однако Харрисон [28] показал, что фиксация фермента происходит за счет образования ковалентных связей с гелем. Чрезвычайно важно, что этот процесс может сопровождаться инактивацией вспомогательного фермента, возрастающей с увеличением времени полимеризации. Для сокращения времени полимеризации Харрисон использует повышенные концентрации как персульфата, так и ТЕМЭД. Однако нам удалось получить хорошие результаты, сохранив неизменными концентрации реагентов, но заменив персульфат на рибофлавин, который проявляет по отношению к ферменту протекторные свойства. Это позволило снизить концентрацию Г-6-ФДГ в геле до 0,5 ед/мл. Использование рибофлавина позволяет лучше сохранить и глюкокиназную активность [27]. К преимуществам этого метода, несомненно, следует отнести то, что иммобилизация вспомогательного фермента в геле позволяет выявлять активность ГК во всей массе геля и одновременно снижает диффузию интермедиатов многокомпонентной реакции в процессе выявления активности фермента. Для стабилизации ГК в процессе электрофореза мы перед полимеризацией вводили в гель глюкозу в концентрации 10 мМ для выявления гексокиназной активности и в концентрации 100 мМ для выявления глюкокиназной активности. Использовали разделяющий гель pH 8,2.

Методика

В работе использовали следующие реактивы: акриламид, бис-акриламид, N, N, N'-тетраметилэтилендиамин, рибофлавин, глицин, трис, глицил-глицин, нитротетразолий фиолетовый, АТФ, НАДФ (фирма «Reanal», Венгрия), феназинметасульфат (Schuchardt ФРГ), Г-6-ФДГ (фирма «Feraк», Зап. Берлин).

Электрофорез проводили в вертикальной пластине полиакриламидного геля в аппарате с двусторонним водяным охлаждением (рис. 1).

Полимеризацию геля и процесс электрофоретического разделения выполняли по Дэвису [30] в предложенной нами модификации. В крупнопористый и мелкопористый гели добавляли глюкозу в конечной концентрации 10 мМ для выявления ГК или 100 мМ для выявления глюкокиназы. Мелкопористый 7,5% (по акриlamиду) гель pH 8,2 получали путем фотополимеризации, используя в качестве катализатора рибофлавин. Непосредственно перед фотополимеризацией в гель добавляли Г-6-ФДГ в количестве 0,5 ед/мл. Крупнопористый гель (pH 6,7) готовили также путем фотополимеризации в течение 30 мин. В нем с помощью гребенки из плексигласа формировали лунки для нанесения образца.

В работе использовали крыс-самцов линии Вистар массой 200—240 г. Животных декапитировали. Все операции проводили в холодной комнате при 0—4°C. Ткани быстро извлекали, отмывали от крови холодным 0,15 М KCl, гомогенизировали в 4-кратном (для печени в 2-кратном) объеме 0,1 М глицил-глицинового буфера pH 7,4, содержащего 5 мМ ЭДТА, 5 мМ меркаптоэтанол и 10 мМ глюкозы. Гомогенат центрифугировали при 45 000 g в течение 2 ч. Надосадочную жидкость смешивали с гелем сефадекса в соотношении 1 : 1 и по 0,2 мл смеси вносили в ячейки из крупнопористого геля. Электрофорез продолжался 2 1/2 ч, после чего пластинку геля извлекали, ополаскивали дистиллированной водой и помещали в инкубационную смесь следующего состава: 30 мл 75 мМ глицил-глицинового буфера pH 8,2, 5 мМ АТФ, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ НАДФ, 2 мМ NaN₃, 10 мМ или 100 мМ глюкозу, 0,4 мг/мл нитротетразолия фиолетового, 0,04 мг/мл феназинметасульфата (указана конечная концентрация реагентов). Контролем на специфическую активность служила инкубационная среда без АТФ. При необходимости раздельного инкубирования фореграмму разрезали бритвой в соответствии с локализацией отдельных образцов. Выявление специфической активности проводили в темноте при 37°C в течение 60—90 мин.

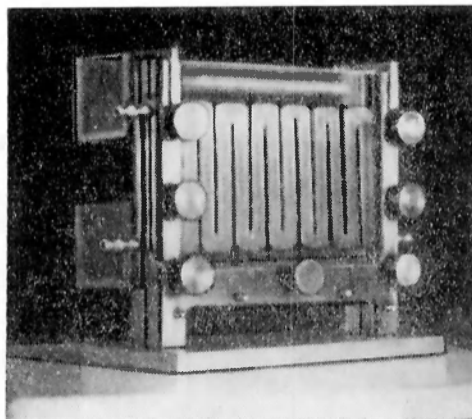


Рис. 1. Аппарат для электрофореза в полиакриламидном геле с двусторонним охлаждением.

Результаты и обсуждение

Предложенный метод был использован для оценки изоферментного спектра ГК в различных тканях. Было показано, что в большинстве исследованных тканей преобладающей формой гексокиназы является ГК-I (рис. 2). Исключение составляет скелетная мускулатура, где наиболь-

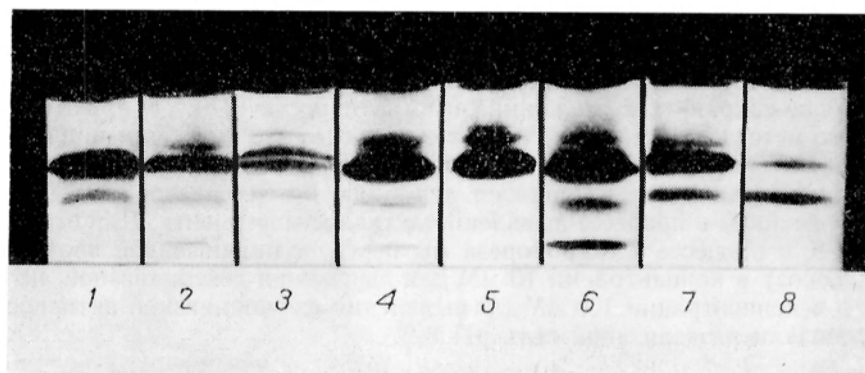


Рис. 2. Изоферментный спектр гексокиназы в различных органах и тканях крысы. 1 — поджелудочная железа; 2 — надпочечники; 3 — семенники; 4 — почки; 5 — мозг; 6 — селезенка; 7 — сердце; 8 — скелетные мышцы.

шей активностью характеризуется ГК-II. С помощью данного метода удалось показать, что в таких тканях, как почка, селезенка, мозг, надпочечники, выявляется дополнительная, более медленная, фракция ГК типа I — пре-ГК-I. Специфичность окраски в опытах с бессубстратным контролем. Выявление этой фракции, вероятно, связано с более высокой разрешающей

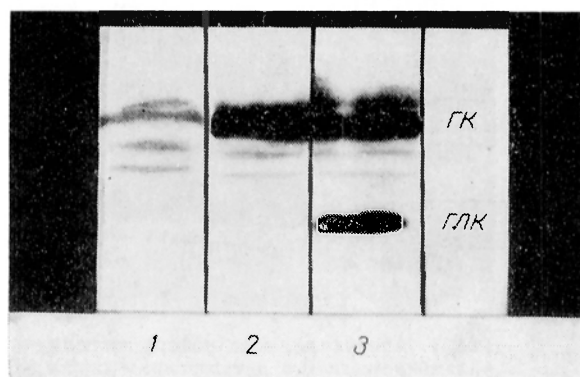


Рис. 3. Влияние концентрации глюкозы на выявление глюкокиназной активности в печени. Концентрация глюкозы: 1 — 0,5 мМ; 2 — 5 мМ; 3 — 100 мМ, GK — гексокиназа; GLK — глюкокиназа.

способностью полиакриламидного геля. Интересно, что в крахмальном геле эта подфракция не выявляется. В мозге представлена главным образом ГК-I. Получена характерная картина в семенниках, где ГК-I расщепляется на 2 фракции, близкие по электрофоретической подвижности, и выявляется менее подвижная форма ГК типа ST [32]. ГК-II в различных тканях мы идентифицировали по термолабильности этого фермента. Известно, что нагревание растворимой фракции ткани до 45°C инактивирует в ней преимуще-

ственно этот тип ГК. Результаты анализа свидетельствуют, что ГК-II характеризуется высокой активностью в скелетных мышцах, значительная активность выявляется также в сердце и селезенке. В почках, надпочечниках, семенниках отмечается низкая активность ГК-II. ГК-III довольно активна в селезенке. Незначительная активность ГК-III выявлена в почках и надпочечниках. Полученные данные по распределению изофермента ГК-III согласуются с данными Катцена и соавт. [31]. Однако в отличие от

этих авторов в наших условиях III тип ГК не ингибируется 100 мМ глюкозой. Использование 100 мМ концентрации глюкозы позволяет выявить глюкокиназную активность в печени крыс. При концентрации глюкозы 0,5 и 5 мМ активность этой фракции не выявляется (рис. 3).

Таким образом, предложенная модификация метода электрофоретического разделения изоферментов ГК и определения их активности достаточно проста, обладает высокой разрешающей способностью, воспроизводимостью, является быстрой, экономичной и может быть рекомендована для широкого круга исследований как в биохимических, так и в клинических лабораториях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gonzalez C., Ureta T., Sanchez R. et al. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1964, v. 16, p. 347. — 2. Gonzalez C., Ureta T., Babu I. — «Biochemistry (Wash.)», 1967, v. 6, p. 460—468. — 3. Ильин В. С., Плесков В. М., Разумовская Н. И. — «Биохимия», 1970, т. 35, с. 312—318. — 4. Battarbee H., Schindler W. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)», 1972, v. 140, p. 584—589. — 5. Murakami K., Imamura Y., Ichibashi S. — «J. Biochem. (Tokyo)», 1973, v. 74, p. 175—177. — 6. Katzen H., Schimke R. — «Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.», 1965, v. 54, p. 1218—1225. — 7. Grossbard L., Schimke R. — «J. biol. Chem.», 1966, v. 241, p. 3546—3560. — 8. Eaton G., Brewer J., Tashian R. — «Nature», 1966, v. 212, p. 944—946. — 9. Hansen R., Pilakis S., Kral M. — «Endocrinology», 1967, v. 81, p. 1397—1404. — 10. Карпан Г., Беттлер Е. — «Science», 1968, v. 159, p. 215—216. — 11. Шаныгина К. И. — «Биохимия», 1971, т. 36, с. 363—368. — 12. Sigman B., Hawkins R., Tildon I. — «Biochem. Med.», 1972, v. 6, p. 29—35. — 13. Плесков В. М. — «Биохимия», 1973, т. 38, с. 283—286. — 14. Чесноков В. Н., Гордиенко О. Е., Мертвцов Н. П. — «Вопр. мед. химии», 1973, № 5, с. 498—501. — 15. Кузнецов О. К., Воронова Л. А., Кравцова Г. Б. — «Цитология», 1974, № 3, с. 347—351. — 16. Murakami K., Ichibashi S. — «J. Biochem. (Tokyo)», 1972, v. 71, p. 675—684. — 17. Sato S., Sugimura T. — «Gann (Tokyo)», 1973, v. 64, p. 359—361. — 18. Anderson I., Tyrell I. — «Gastroenterology», 1973, v. 65, p. 69—76. — 19. Ueda M., Taketa K., Shimamura I. et al. — «Clin. chim. Acta», 1974, v. 53, p. 381—383. — 20. Galton D., Wilson I. — «Clin. Sci.», 1971, v. 41, p. 545—553. — 21. Galton D., Jones A. — «Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)», 1967, v. 126, p. 479—481. — 22. Покровский А. А., Никитина Л. В., Коровников К. А. — «Вопр. питания», 1972, № 6, с. 44—50. — 23. Hard R. — «Biochim. biophys. Acta», 1971, v. 251, p. 413—418. — 24. Алексахина Н. В., Ситникова Н. Ю. — «Научн. докл. высш. школы. Биол. науки», 1972, № 10, с. 28—33. — 25. Нейфах С. А., Монахов Н. К., Шварцман А. Л. — «Докл. АН СССР», 1972, т. 206, с. 743—746. — 26. Монахов Н. К., Шавловский М. М., Шварцман А. Л. и др. — Там же, 1973, т. 213, с. 1445—1448. — 27. Grossman S., Potter V. — «Analyt. Biochem.», 1974, v. 59, p. 54—62. — 28. Harrison R. — Ibid., v. 61, p. 500—507. — 29. Neumann S., Pfeleiderer G. — «Biochim. biophys. Acta», 1974, v. 334, p. 343—353. — 30. Davis B. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1964, v. 121, p. 404—427. — 31. Katzen H., Soderman D., Cirillo V. — Ibid., 1968, v. 151, p. 351—358.

Поступила 15/VI 1977 г.

ESTIMATION OF HEXOKINASE ISOENZYMES IN VARIOUS TISSUES

G. G. Shurda, L. E. Panin

Laboratory of Biochemistry, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Novosibirsk

A modified method is described for estimation of hexokinase isoenzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. The best conditions for detection of hexokinase activity were developed using immobilization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in gel, utilization of riboflavin as a catalyst of polymerization and stabilization by glucose. The method is simple, highly reproducible, comparatively rapid and economically reasonable.

СОДЕРЖАНИЕ

- Калинкин М. Н., Бельченко Д. И. Влияние длительного введения атерогенных фракций липопротеидов на липидограмму крови и миокарда кроликов 147
- Меркурьева Р. В., Бушинская Л. И., Аулика Б. В., Шатерникова И. С., Проценко Е. И., Кулыгина А. А., Экслер Н. Д. Активность лизосомальных и цитоплазматических ферментов при экспериментальном действии сероуглерода 151
- Суббота Н. П., Белоус А. М. Концентрация цитохромов при различных сроках и низкотемпературных условиях хранения гомогенатов коры почки крысы 156
- Кричевская А. А., Лукаш А. И., Пушкина Н. В., Шерстнев К. Б. Спонтанное дезамидирование γ -глобулина 160
- Зубер В. Л. Интенсивность обмена отдельных фракций фосфолипидов мозга при гиперфенилаланинемии 163
- Щеколдина Т. Г., Ватолкина О. Е., Либинзон Р. Е. Влияние психотропных препаратов на активность фосфодиэстеразы цАМФ коры головного мозга крысы 166
- Попова Г. М. Церебросиды глиом мозга человека 169
- Тесленко Л. В., Усатенко М. С. Активность валил- и аланил-гРНК-синтетаз в скелетных мышцах кролика при диабете и введении в организм инсулина 172
- Флеров М. А. Распределение и метаболизм фосфолипидов нейронов и нейроглии 174
- Векслер Я. И., Магомедова К. М., Луговец В. М. Особенности метаболической реакции центральной нервной системы на стресс при острой алкогольной интоксикации 180
- Силуянова С. Н., Еременко В. В. Фосфорилирование тимидина с участием тимидинкиназы из зобной железы и печени крыс в присутствии фактора из *Cl. perfringens* (welchii) 184
- Таранова Н. П. Гликолипиды головного и спинного мозга морских свинок при интоксикации трикрезилфосфатом 188
- Воскобойников Г. В., Хансон К. П. Содержание тиаминосоединений в моче больных при

CONTENTS

- Kalinkin, M. N., Bel'chenko, D. I.: Effect of Prolonged Administration of Atherogenic Fractions of Lipoproteins on Lipid Spectra in Rabbit Blood and Myocardium 147
- Merkur'eva, R. V., Bushinskaya, L. I., Aulika, B. V., Shaternikova, I. S., Protsenko, E. I., Kulygina, A. A., Exler, N. D.: Activity of Lysosomal and Cytoplasmic Enzymes in Experimental Intoxication with Carbon Disulfide 151
- Subbota, N. P., Belous, A. M.: Content of Cytochromes in rat Kidney cortex at Various Periods and Low-Temperature Conditions of Storage 156
- Krichevskaya, A. A., Lukash, A. I., Pushkina, N. V., Shertnev, K. B.: Spontaneous Deamidation of γ -globulin 160
- Zuber, V. L.: The Intensity of Metabolism of Some Brain Phospholipid Fractions in Hyperphenylalaninemia 163
- Schekoldina, T. G., Vatulkina, O. E., Libinzon, R. E.: Effect of Psychotropic Preparations on the Activity of cAMP Phosphodiesterase in Brain Cortex 166
- Pопова, G. M.: Cerebrosides of Human Brain Gliomas 169
- Teslenko, L. V., Usatenko, M. S.: The Activity of Valyl- and Alanil TRNA Synthetases in Skeletal Muscles of Diabetic and Insulin Treated Rabbits 172
- Flerov, M. A.: Distribution and Metabolism of Phospholipids in Neurons and Neuroglia 174
- Vexler, Ya. I., Magomedova, K. M., Lugovetz, V. M.: Characteristics of Metabolic Response of Central Nervous System on the Stress in Acute Alcohol Intoxication 180
- Siluyanov, S. N., Eremenko, V. V.: Effect of Thymidine Kinase from Rat Strumous Gland and Liver on Thymidine Phosphorylation in Presence of CPW Factor from *Clostridium Perfringens*/Welchii 184
- Taranova, N. P.: Brain and Spinal Cord Glycolipids of Guinea Pigs After Intoxication with Tricresylphosphate 188
- Voskoboynikov, G. V., Hanson, K. P.: Use of Iodine-Azide and Selenous Acid Reagents for Estimation

- определении с помощью йод-азидного реагента и по реакции с селенистой кислотой 193
- Фанченко Н. Д., Минина Л. С., Щедрина Р. Н. Особенности эстрадиол-рецепторного взаимодействия в цитозоле фаллопиевых труб человека 198
- Ларионов Н. П., Кротенко Н. М. Сравнительное исследование изменений АТФ-азной активности актомиозина и активности гликолитических ферментов скелетных мышц в раннем постнатальном периоде развития 202
- Иванов Г. Г. Распределение и некоторые свойства щелочной фосфатазы в слизистой оболочке желудка человека при язвенной болезни 206
- Сергеев А. В., Быковская С. Н., Раушенбах М. О. Биосинтез пиридоксаль-5'-фосфата в лимфоцитах, стимулированных аллоантигенами in vitro 211
- Ширинян Э. А., Авакян О. М. Влияние адrenaлэктоми и химической симпатэктоми на содержание катехоламинов в центральной нервной системе при геморрагическом стрессе 216
- Величко М. Г., Островский Ю. М., Требухина Р. В. Тиамин и обмен пирувата у крыс-опухоленосителей 220
- Моррисон В. В. Об изменении уровня гистамина и серотонина в аппарате внешнего дыхания при ботулинической интоксикации у кошек 224
- Усова А. А., Остапенко И. А., Этингер Р. Н. Белковый ингибитор фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов в сетчатке при ее наследственной дегенерации 227
- Федуров В. В. Регуляция обмена убихинонов: исследование в регенерирующей печени крыс 232
- Соколов А. В., Козляева Г. А., Меснянкина Н. В., Татарин Ю. С. Выделение и очистка специфического β_1 -г-глобулина 240
- Титов В. Н., Пицин Д. Г. О патогенезе гиперлипидемии у крыс после введения этанола 244
- Никольская И. И., Лопатина Н. Г., Рекунова В. Н., Юркевич А. М., Дебов С. С. О влиянии S-нуклеозил-L-гомоцистеинов на активность некоторых метилаз ДНК 252
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. Значение комплекса фибриноген-гепарин в фибринолитической активности эуглобулиновой фракции крови после внутривенного введения тромбина или плазмина 255
- Уласевич И. И. Влияние витамина К на перекисное окисление липидов в условиях Е-авитаминоза 260
- of Thioamines Content in Urine of Patients
- Fanchenko, N. D., Minina, L. S., Schedrina, R. N.: Characteristics of Estradiol-Receptor Interaction in Cytosole of Human Fallopian Tubes
- Larionov, N. P., Krotenko, N. M.: Dynamics of Actomyosin ATPase Activity as Compared with Glycolytic Enzymes Activity in Skeletal Muscles at Early Postnatal Period of Development
- Ivanov, G. G.: Distribution and Some Properties of Alkaline Phosphatase in Human Gastric Mucosa under Ulcerous Impairment
- Sergeev, A. V., Bykovskaya, S. N., Raushenbah, M. O.: Biosynthesis of Pyridoxal-5'-Phosphate in Lymphocytes, Stimulated by Alloantigens in vitro
- Shirinyan, E. A., Avakyan, O. M.: Effect of Adrenalectomy and Chemical Sympathectomy on the Content of Catecholamines in Central Nervous System in Hemorrhagic Stress
- Velichko, M. G., Ostrovsky, Yu. M., Trebukhina, R. V.: Thiamine Therapy and Pyruvate Metabolism in Tumor Carrying Rats
- Morrison, V. V.: On Alteration in Histamine and Serotonin Content in External Respiratory System of Cats with Botulinic Intoxication
- Usova, A. A., Ostapenko, I. A., Etingof, R. N.: Protein Inhibitor of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase in Hereditary Dystrophy of Retina
- Fedurov, V. V.: Regulation of the Metabolism of Ubiquinone: Studies in Regenerating Rat Liver Tissue
- Sokolov, A. V., Kozlyayeva, G. A., Mesnyankina, N. V., Tatarinov, Yu. S.: Isolation and Purification of Specific β_1 -G-Globulin
- Titov, V. N., Pitzin, D. G.: On Pathogenesis of Hyperlipoproteinemia in Rats After Administration of Ethanol
- Nikol'skaya, I. I., Lopatina, N. G., Rekunova, V. N., Yurkevich, A. M., Debov, S. S.: On the Effect of S-Nucleosyl Homocysteines on Activity of Several DNA Methylases
- Kudryashov, B. A., Liapina, L. A., Ul'yanov, A. M.: Importance of Fibrinogen-Heparin Complex in Fibrinolytic Activity of Blood Euglobulin Fraction After Intravenous Administration of Thrombin or Plasmin
- Ulasovich, I. I.: Effect of Vitamin K on peroxidation of Lipids in E-Avitaminosis

Никитина З. К., Шишкин С. С., Томашевич С. В., Дебов С. С. Изучение деградации рибосомной РНК в скелетной мышце крыс в процессе автолиза	262	Nikitina, Z. K., Shishkin, S. S., Tomashevich, S. V., Debov, S. S.: Degradation of Ribosomal RNA in Rat Skeletal Muscle During Autolysis
Исаева В. А., Спиричев В. Б. Относительное содержание α -, β - и γ -цепей растворимых фракций коллагена костной ткани крыс при различной обеспеченности витамином D	270	Isaeva, V. A., Spirichev, V. B.: Relative Content of α , β and γ -Chains of Soluble Collagen Fractions in Bone Tissue Under Various Sufficiency of Vitamin D
Меерсон Ф. З., Явич М. П., Горач Г. Г. Метаболизм поли-А ⁺ -содержащей иРНК миокарда в норме и при компенсаторной гиперфункции сердца	275	Meerson, F. Z., Yavich, M. P., Gorach, G. G.: Turnover of PolyA ⁺ Containing mRNA of Myocardium in Normal State and in Heart Compensatory Hyperfunction
Методы биохимических исследований		Methods of Biochemical Investigations
Шурда Г. Г., Панин Л. Е. Об определении изоферментов гексокиназы в различных тканях	282	Shurda, G. G., Panin, L. E.: Estimation of Hexokinase Isoenzymes in Various Tissues

Техн. редактор Н. К. Арибжанова

Корректор О. А. Лосой

Сдано в набор 17/1 1978 г. Подписано к печати 6/II 1978 г. Формат бумаги 70×108^{1/16}
печ. л. 9,0 (условных 12,60 л.) уч.-изд. л. 13,58 Тираж 2091 экз. Заказ 149

Издательство «Медицина». Москва, Петроверигский пер., 6/8.
Чеховский полиграфический комбинат Союзполиграфпрома
при Государственном комитете Совета Министров СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области