

А. А. Карелин

**ЦИКЛО-3', 5'-АМФ В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА КРЕАТИНА  
У МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ЦИКЛО-АМФ-ОПОСРЕДУЕМАЯ  
ГОРМОНАЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ГУАНИДИНАЦЕТАТ-N-  
МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ<sup>1</sup>**

Лаборатория энзимологии АМН СССР, Москва

Проведенные в последние годы исследования показали, что циклический аденозин-3', 5'-монофосфат (цАМФ) играет важную роль во внутриклеточной регуляции креатинсинтезирующего фермента гуанидинацетат-N-метилтрансферазы—ГУАМТ (КФ 2. 1.1.2) [1—12] и [98] и стимулируемой гормонами продукции креатина [13, 14]. Креатин является энергетическим субстратом, регулирующим в сердце и мышцах продукцию энергии, необходимую для сократительных процессов [15—22], и транспорт этой энергии из мест ее синтеза к месту утилизации [17, 19, 23].

Однако креатин не принимает участия в регуляции метаболизма энергии в основных местах его синтеза — печени, почках, поджелудочной железе. Эта функция креатина, как, впрочем, и другие функции, необходима для организма в целом [24, 25]. В связи с этим изучение цАМФ-опосредуемой гормональной активации биосинтеза креатина согласуется с присущей цАМФ функцией у многоклеточных организмов — удовлетворять потребности целого организма в источниках энергии и пищи за счет внутренних ресурсов [26].

*История вопроса.* Исторической предпосылкой, приведшей к пониманию причастности цАМФ к регуляции ГУАМТ и, следовательно, к синтезу биологически важного креатина послужили работы конца 40-х и начала 50-х годов Борсука и Дубнова [27], Фиданцы [28] и Когена [29, 30] по изучению метилирования гуанидинуксусной кислоты *in vitro* в срезе и гомогенатах ткани печени.

Как сообщили в 1947 г. Борсук и Дубнов [27], усиливающее действие АТФ на биосинтез креатина в полной креатинсинтезирующей системе (гуанидинуксусная кислота, L-метионин АТФ), инкубируемой в атмосфере 95% O<sub>2</sub>: 5%CO<sub>2</sub>, было неодинаковым в различных гомогенатах печени от опыта к опыту. Однако в среднем выход синтезированного креатина в гомогенатах и срезах печени морской свинки был в 2 раза выше, когда добавляли АТФ в концентрации 1,5·10<sup>-3</sup> М [27]. Ионы Mg<sup>2+</sup> также требовались для активации ГУАМТ [29], почти полностью присутствующей в надосадочной жидкости после центрифугирования гомогената печени [30]. АТФ и ионы Mg<sup>2+</sup> могли требоваться для внутриклеточного синтеза S-аденозилметионина [31], первичного метильного донора, образующегося из АТФ и метионина под воздействием S-аденозилметионинсинтетазы (метионин-S-аденозилтрансферазы, КФ 2. 4.2.13). Однако в опытах Борсука и Дубнова стимулирующее влияние АТФ на синтез креатина *in vitro* на-

<sup>1</sup> В данном обзоре термин «активация» ГУАМТ под воздействием циклического АМФ (цАМФ) употребляется в смысле повышения активности фермента безотносительно к тому, имеется ли увеличение скорости синтеза фермента *de novo* или активация цАМФ уже образованного, но неактивного энзима.

блюдалось не только в гомогенатах, но и в срезах печени [27], где, как известно, сохраняется неповрежденной клеточная мембрана и где присутствует мембранносвязанная аденилциклаза [32]. Срезы печени млекопитающих превращали гликоциамин (гуанидинуксусную кислоту) в креатин в присутствии метионина. Метилксантин (кофеин) был не способен выступать в качестве донора метильной группы в реакции метилирования гуанидинуксусной кислоты [33].

Борсук и Дубнов заключили, что АТФ требуется для трансметилирования гуанидинуксусной кислоты. Функция кислорода как в срезах, так и в гомогенатах ткани состоит, по мнению упомянутых выше авторов, в под-

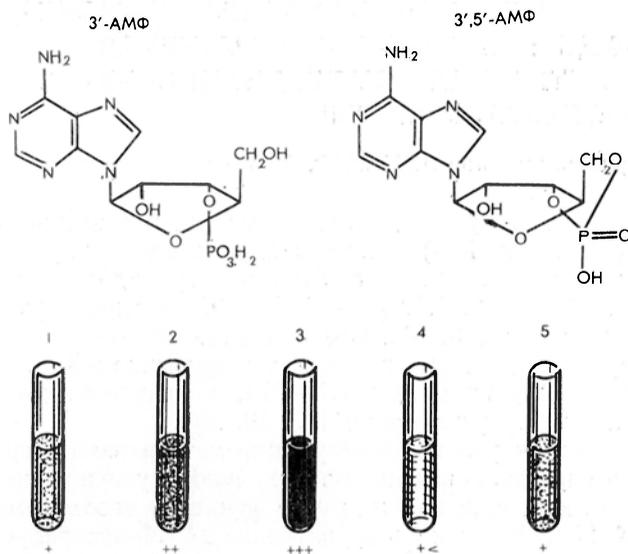


Рис. 1. Структурные формулы аденозин-3'-монофосфата (3'-АМФ) и циклического аденозин-3',5'-монофосфата (3',5'-АМФ). Схематическое изображение первых опытов по связи 3',5'-АМФ с регуляцией панкреатической ГУАМТ *in vivo*.

1 — контроль; 2 — ПОЖП; 3 — ПОЖП + введение теофиллина (3 мг на 100 г массы); 4 — ПОЖП + введение 3'-АМФ; 5 — ПОЖП + введение теофиллина (3 мг на 100 г массы) + введение 3'-АМФ. Интенсивность креатининпикратной реакции [55] в тест-пробах обозначена числом крестов.

держании окисления [27], которое снабжает клетки АТФ. Окисление поддерживали добавляемые в инкубационную среду фумаровая,  $\alpha$ -кетоглутаровая и яблочная кислоты, которые также стимулировали синтез креатина *in vitro*.

Примерно в это же самое время в 1948 г. Фиданца [28] показал, что инкубация тканевых срезов печени в атмосфере 95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub> в присутствии гуанидинуксусной кислоты и метилксантинов (кофеина, теобромина или теофиллина) приводит к дополнительному синтезу креатина *in vitro*. Фиданца предположил, что это связано с утилизацией метильных групп метилксантинов, которые выступают в качестве метильных доноров [28].

Спустя 10 лет, в 1957 г., условия, в некотором отношении подобные описанным выше, были использованы Сатерлендом и Роллом при исследовании образования цАМФ в гомогенатах печени и фракциях клеточных оболочек (particulate fractions), содержащих мембраносвязанную аденилциклазу [34]. Обычная система для продукции цАМФ тканевыми препаратами содержала трисбуфер, АТФ, ионы магния, кофеин и NaF [32, 35, 36]. Кислород, как и в системе синтеза креатина, был обязательным компонентом системы синтеза цАМФ. Анаэробные условия снижали образование цАМФ из АТФ, а кофеин, фторид натрия и фумаровая кислота стимулировали его. Эффект тестировали по увеличению активности фосфорилазы гликогена в печени [35].

Подобно стимуляции энзиматического синтеза креатина, образование в печени активной фосфорилазы гликогена требовало добавления АТФ, ионов магния, кофеина [37]. Работы, проведенные в конце 40-х годов, по активации биосинтеза креатина в печени с помощью АТФ, Mg<sup>2+</sup> [27], метилксантинов (кофеина, теофиллина, теобромина) [28] не навели на мысль о возможном превращении АТФ в гомогенатах и срезах печени в цАМФ —

важнейший внутриклеточный регулятор, который, как выяснилось, и оказывал стимулирующее влияние на активность ГУАМТ. Прямых доказательств участия цАМФ в регуляции креатинообразующего фермента не существовало вплоть до 1972 г.

Наше наблюдение, сделанное в 1970 г., состояло в том, что активность панкреатической ГУАМТ в гомогенате поджелудочной железы крысы, предварительно стимулированная перевязкой общего желчного протока (ПОЖП), резко повышалась после введения животным теофиллина. Этот эффект был менее выраженным, если одновременно с теофиллином крысам вводили аденозин-3'-монофосфат (3'-АМФ) (рис. 1).

Известно, что 3'-АМФ, дрожжевая адениловая кислота, является соединением, родственным по структуре циклическому 3', 5'-АМФ [42] (см. рис. 1): все пуриновые циклические нуклеотиды превращаются в соответствующие нуклеозид-3'-фосфаты после обработки растительной РНК-азой [38]. 3'-АМФ служит материалом для синтеза цАМФ [39].

Поскольку теофиллин и другие метилксантины задерживают энзиматическую инактивацию цАМФ [32, 40, 41], то наблюдавшееся нами повышение активности гуанидинацетат-N-метилтрансферазы после введения крысам теофиллина и снижение активности после одновременного с теофиллином введением 3'-АМФ могли осуществляться через механизм изменения внутриклеточной концентрации цАМФ. Многие гормоны оказывают влияние на метаболизм подобно экзогенно введенному теофиллину [43, 44]. Сопоставление обнаруженных нами наблюдений *in vivo* с ранее показанным Фиданцой фактом дополнительного синтеза креатина *in vitro* в присутствии метилксантинов (кофеин, теобромин, теофиллин) подкрепляло предположение о причастности цАМФ к внутриклеточному контролю активности креатинообразующего фермента.

*Связь активации ГУАМТ поджелудочной железы крыс с ПОЖП.* В 1948 г. Сатерленд и де Дюв [45, 46] впервые показали, что перевязка панкреатического протока у животных приводит к увеличению содержания глюкагона на единицу массы ткани по сравнению с таковым в нормальной ткани поджелудочной железы [45, 46]. ПОЖП у крыс, адекватная перевязке панкреатических протоков у других животных, приводит одновременно к застою желчи в печени и панкреатического секрета в поджелудочной железе [47]. Она также сопровождается увеличением содержания глюкагона в поджелудочной железе крыс [48, 49], так как лигирование панкреатического протока вызывает атрофию экзокринной ткани без повреждения эндокринной функции островковой ткани, в том числе периферически расположенных  $\alpha$ -клеток поджелудочной железы [50, 51]. Мы избрали поджелудочную железу крысы в качестве объекта для исследования активности ГУАМТ, а не печень, потому что активность фермента, определяемая обычным методом [52], в поджелудочной железе крыс оказалось выше, чем в печени. Она значительно стимулируется после ПОЖП [1, 2]. Очевидно, накапливающийся в железе панкреатический глюкагон, по терминологии Сатерленда «первый мессенджер», мог переносить информацию из  $\alpha$ -клеток на экзокринные клетки внутри поджелудочной железы как единого органа, не перемещаясь, таким образом, с током крови к ткани-мишени [53], подобно действию панкреатического глюкагона на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы или в случае нейрогуморальной передачи внутри автономной нервной системы [53]. По-видимому, в условиях ПОЖП панкреатический глюкагон стал действовать на экзокринные панкреатические клетки подобно химически родственному гормону секретину и, вызывая внутриклеточную продукцию «второго мессенджера» — цАМФ, активировал ГУАМТ [2]. Одновременно введенный теофиллин, очевидно, потенцирует действие аккумулялированного гормона на активацию фермента.

Данные по активации панкреатической гуанидинацетат-метилтрансферазы после ПОЖП хорошо коррелируют с имеющимися в литературе мно-

гочисленными сведениями о накоплении глюкагона в поджелудочной железе животных с лигированным протоком [45, 46, 48—51, 54].

Связь активации ГУАМТ в поджелудочной железе и печени крыс с цАМФ *in vivo*. Из табл. 1 видно, что активность ГУАМТ в поджелудочной железе крыс наиболее значительно повышается после введения цАМФ.

Таблица 1

Влияние циклического 3',5'-АМФ, теофиллина, 3'-АМФ, 5'-АМФ, гидрокортизона, адреналина, секретина, инсулина, АКТГ на активность ГУАМТ в поджелудочной железе крыс *in vivo* через 3 ч после перевязки общего желчного протока [2]

Вещество, введенное в брюшную полость	Число животных	Активность ГУАМТ, мкмоль креатина на 1 г сухой ткани за 4 ч при 37° С
0,9% NaCl	6	3,48±0,27
Циклический 3',5'-АМФ	4	8,95±0,82
Теофиллин	7	8,51±1,20
3'-АМФ	5	4,95±0,46
5'-АМФ	5	3,35±0,46
Гидрокортизон	8	4,67±0,45
Адреналин	4	7,76±1,45
Секретин	4	6,04±1,29
Инсулин	8	6,18±0,37
АКТГ	4	7,50±0,81

После введения других нуклеотидов (5'-АМФ; 3'-АМФ) активность ГУАМТ составляет приблизительно 50 % от активности фермента после введения цАМФ.

Среди испытанных нами гормонов наиболее выраженное стимулирующее действие на активность панкреатической гуанидин-ацетат-N-метилтрансферазы *in vivo* оказывали адреналин и АКТГ. Эти данные косвенно согласуются с тем, что адреналин стимулирует аденилциклазу эндокринных клеток поджелудочной железы и связанную с этим продукцию цАМФ [56].

Когда цАМФ был введен крысам внутрибрюшинно через 2 ч после ПОЖП и животные были декапитированы через 4 ч, активность ГУАМТ увеличилась в 3 раза по сравнению с таковой в контроле [6, 7].

Для получения дополнительной информации о роли цАМФ в регуляции креатинсинтезирующего фермента в поджелудочной железе *in vivo* была изучена активация ГУАМТ теофиллином. Известно, что введение теофиллина животным повышает в тканях концентрацию цАМФ [57] путем специфического ингибирования цикло-3', 5'-АМФ-фосфодиэстеразы [40], гидролизующей цАМФ до 5'-АМФ. Активность ГУАМТ после введения крысам теофиллина увеличивается при сравнении с таковой у интактных животных в среднем в 2 раза и почти в 4 раза по сравнению с исходной активностью фермента у животных, подвергшихся контрольной лапаротомии. Достигнув максимума к 60-й минуте, в дальнейшем активность ГУАМТ в гомогенатах поджелудочной железы крыс снижается и через 5 ч становится даже ниже исходного значения. Активность ГУАМТ в гомогенатах поджелудочной железы крыс, не обработанных теофиллином, повышается через 1 ч, достигая максимума через 3 ч с последующим снижением к 4—6 ч.

При комбинированном введении крысам АКТГ, секретина, адреналина, глюкагона с теофиллином максимальный суммирующий эффект на активность ГУАМТ был получен при совместном введении глюкагона и теофиллина. Это позволяет предположить, что глюкагон или родственные ему гормон оказывает свое влияние на активацию ГУАМТ через цАМФ. Доказательством причастности цАМФ к внутриклеточной регуляции панкреатической ГУАМТ были опыты с блокированием активности и секреции фермента, индуцированных цАМФ и теофиллином, посредством 3'-АМФ.

Этот структурный аналог цАМФ подавляет увеличение активности панкреатической ГУАМТ, вызванное введением цАМФ или теофиллина (табл. 2). 3'-АМФ полностью блокирует секрецию фермента с желчью и

панкреатическим секретом в условиях стимуляции секретинном и билоптином (см. табл. 2).

Из табл. 2 видно, что для секреции ГУАМТ в общий желчный проток, вызванной секретинном и билоптином, требуется цАМФ. 3'-АМФ, по-видимому, конкурентно занимает рецепторный центр, соответствующий цАМФ, и блокирует секрецию фермента, выполняя роль метаболического антагониста.

Полученные данные согласуются с концепцией Шрамма [58, 59] о важной роли цАМФ в секреции макромолекул ферментов при физиологических условиях. Вместе с тем отмеченный факт, вероятно, должен при-

Таблица 2

Влияние циклического 3', 5'-АМФ и 3'-АМФ на индукцию ГУАМТ в поджелудочной железе крыс и на секрецию фермента печенью и поджелудочной железой после ПОЖП и воздействия стимуляторами *in vivo* [2]

Введенное соединение	Активность ГУАМТ в поджелудочной железе, мкмоль креатина на 1 г сухой ткани за 4 ч при 37° С	Активность ГУАМТ в застойной желчи и панкреатическом секрете, мкмоль × 10 г креатина за 2 ч при 37° С *
Циклический 3'-5'-АМФ	13,0±0,67 (4)	1,15
3'-АМФ	5,29±0,41 (4)	0
Теofilлин + 3', 5'-АМФ	12,40±0,65 (3)	1,22
Теofilлин + 3'-АМФ	4,34±0,99 (5)	0
Секретин	6,04±1,20 (4)	0,52±0,21 (5)
Секретин + 3'-АМФ	6,19±1,16 (4)	0
Секретин + теofilлин	—	0,98
Секретин + теofilлин + 3'-АМФ	—	0
Билоптин + теofilлин	—	1,40
Билоптин + теofilлин + 3'-АМФ	—	0

Примечание. Звездочкой обозначено, что креатин был определен диацетильным методом. Представлены средние данные ( $M \pm m$ ). В скобках — число опытов. В каждый опыт брали секрет, полученный от 3—4 крыс.

влечь внимание патофизиологов и клиницистов к важной роли цАМФ как «второго мессенджера» в действии гормональных влияний на секрецию ферментов с желчью и панкреатическим секретом в условиях патологии: стимулируемая гормонами секреция ферментов печенью и поджелудочной железой в общий желчный проток при обтурации камнем, опухолью или иным препятствием для нормального оттока секрета.

Влияние N<sup>6</sup>-O<sup>2'</sup>-дибутирилцикло-3', 5'-АМФ на активацию ГУАМТ в печени и поджелудочной железе крыс *in vivo*. Одним из критериев участия цАМФ в действии гормона на тот или иной физиологический процесс является способность цАМФ имитировать действие этого гормона на клетки ткани-мишени [53, 60].

Однако в некоторых экспериментальных системах цАМФ оказывается неэффективным, что может быть связано с его быстрой деградацией под действием цикло-3', 5'-АМФ-фосфодиэстеразы [41, 44]. Поэтому более обнадеживающие результаты дает исследование с применением производных цАМФ и в первую очередь N<sup>6</sup>-O<sup>2'</sup>-дибутирилцикло-3', 5'-АМФ.

Данные о стимулирующем влиянии N<sup>6</sup>-O<sup>2'</sup>-дибутирил-3', 5'-АМФ и теofilлина на активность ГУАМТ в печени и поджелудочной железе *in vivo* приведены в табл. 3.

Полученные данные показывают, что стимулирующее влияние дибутирил-цАМФ на активность ГУАМТ *in vivo* проявляется не только в поджелудочной железе, но и в печени. Необходимо отметить, что у млекопитающих печень является главным местом синтеза креатина [33, 61]. Структурное сходство дибутирилцикло-3', 5'-АМФ с известными ингибиторами фосфодиэстеразы может объяснять присущую ему устойчивость к действию

циклонуклеотидфосфодиэстеразы [62, 63]. Подобно ингибиторам фосфодиэстеразы, дибутирил-цАМФ может повышать внутриклеточную концентрацию цАМФ и по крайней мере часть эффектов этого соединения связана с эндогенной генерацией цАМФ [64].

*Влияние секретина и глюкагона на активацию ГУАМТ в поджелудочной железе и печени крыс in vivo.* Секретин, полипептидный гормон, синтезируемый в тонком кишечнике, по своей химической структуре подобен

Т а б л и ц а 3

Влияние дибутирилцикло-3',5'-АМФ, цАМФ и теофиллина на активность ГУАМТ в печени и поджелудочной железе крыс [6, 7]

Условия	Введенные соединения	Креатин на 1 г ткани за 2 ч, мкмоль	
		печень	поджелудочная железа
Интактные крысы, декапированные через 2 ч после инъекции	0,9% NaCl	0,31±0,03 (3)*	0,48±0,02 (3)*
	Дибутирил-3',5'-АМФ + теофиллин	0,69±0,04 (4)*	0,57±0,02 (4)*
	Дибутирил-3',5'-АМФ + теофиллин + циклогексимид	0 (4)	0 (4)
	Дибутирил-3,5'-АМФ + теофиллин + актиномицин	0 (4)	0 (3)
Инъекция одновременно с ПОЖП и декапитация крыс через 4 ч	Контроль	—	3,76±0,036 (4)
Инъекция через 2 ч после ПОЖП и декапитация крыс через 4 ч	3',5'-АМФ	—	8,14±0,23 (4)
	Контроль	—	5,42±0,23 (6)
	Теофиллин	—	10,28±0,24 (3)
	Дибутирил-3',5'-АМФ	—	13,61±0,48 (4)

Примечание. Звездочкой обозначена активность ГУАМТ в расчете на 1 г сырой ткани, остальные значения активности ГУАМТ выражены на 1 г сухой ткани. В скобках — число опытов.

глюкагону [65]. 14 аминокислотных остатков из 27 у секретина и 29 у глюкагона, включая N-концевой гистидин, находятся в одном и том же положении у обоих гормонов [99].

Ранее было показано, что секретин, введенный крысам в отдельности или совместно с теофиллином, повышает активность панкреатической ГУАМТ в меньшей степени, чем теофиллин или андрепалин [2]. В то же время известно, что секретин активирует аденилциклазу экзокринных клеток поджелудочной железы, вызывая продукцию цАМФ [66, 67], который является медиатором действия этого гормона на экзокринные панкреатические клетки [68].

Специфическое расположение 27 аминокислотных остатков в молекуле секретина остается «понятным» только для экзокринных клеток поджелудочной железы и, по-видимому, для жировых клеток. В этом смысле он является передатчиком информации от эндокринных клеток слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки к клеткам поджелудочной железы.

Оказалось, что после замораживания и последующего оттаивания поджелудочных желез крыс, предварительно обработанных большой дозой секретина (2 ед.), активность ГУАМТ в гомогенате поджелудочной железы увеличивается в 6 раз по сравнению с контролем (обработка 0,9% NaCl). Введение секретина совместно с теофиллином приводит к еще большему повышению активности ГУАМТ при данных условиях.

Можно предполагать, что замораживание и оттаивание приводят либо к конформационным изменениям структурных компонентов мембраны (аденилциклазы) для секретина, либо к изменению самого секретина. Не исключено, что замораживание и оттаивание панкреатических клеток вы-

зывают активацию цАМФ-зависимой протеинкиназы, подобно тому, как это было показано при исследовании влияния глюкагона на активность киназы фосфорилазы «в» [69]. Известно также, что замораживание и оттаивание ткани вызывают увеличение каталитической активности аденилциклазы [70].

Способность структурного аналога секретина — глюкагона резко стимулировать активность панкреатической ГУАМТ при совместном введении с теофиллином *in vivo* подтверждает предположение о том, что глюкагон

Таблица 4  
Влияние глюкагона и инсулина на активность ГУАМТ в печени интактных крыс [6, 7]

Вводимый агент	Креатин на 1 г сырой ткани за 2 ч, мкмоль	
	контроль	введение инсулина
0,9% NaCl	0,11±0,03 (4)	2,02±0,11 (5)
Глюкагон	0,97±0,24 (7)	2,72±0,20 (3)
Глюкагон + циклогексимид	0,20±0,06 (4)	0,89±0,27 (8)

является потенциальным регулятором цАМФ-опосредуемой активности активации ГУАМТ печени, так как в клетках печени нет рецептора для секретина [71]. Секретин не стимулирует аденилциклазу клеток печени крысы [72].

Таким образом, по нашим данным, не наблюдается принципиальных расхождений в способности полипептидных гормонов, родственных по своей структуре (секретин, глюкагон), активировать ГУАМТ в клетках поджелудочной железы. Это показывает, что «общие фрагменты» пептидных гормонов, имеющих родственную структуру, могут внести вклад в образование вторичного внутриклеточного сигнала, в данном случае цАМФ, на основе какого-то общего физико-химического механизма. Подобная картина наблюдалась при исследовании влияния аналога АКТГ-меланоцитстимулирующего гормона на способность продуцировать увеличение уровня цАМФ в надпочечниках и стимулировать стероидогенез [73].

Поскольку, однако, главным методом синтеза креатина у млекопитающих является печень [61], а глюкагон специфически связывается с рецептором на поверхности клеток печени [74—76] и, стимулируя аденилциклазу [77], вызывает аккумуляцию цАМФ, то можно полагать, что система глюкагон — цАМФ ответственна за контроль синтеза креатина в печени млекопитающих. По-видимому, глюкагон активирует не только фосфорилазу печени, ускоряя гликогенолиз [37], но и другие ферменты печени, в частности креатинобразующий энзим — ГУАМТ.

Как видно из табл. 4, глюкагон в 9 раз увеличивает активность ГУАМТ в печени интактных крыс. Предварительная обработка крыс инсулином в 2,8 раза повышает этот эффект глюкагона. Ингибитор синтеза белка циклогексимид предотвращает увеличение активности ГУАМТ.

То, что глюкагон, введенный крысам совместно с теофиллином, оказывает дополнительное стимулирующее влияние на панкреатическую гуани-

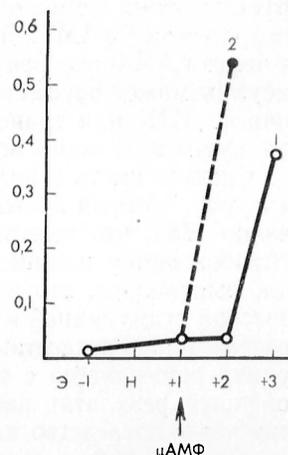


Рис. 2. Зависимость повышения активности ГУАМТ печени крыс от возраста после рождения. Преждевременная индукция ГУАМТ циклическим АМФ [12].

1 — индукция ГУАМТ печени крыс без введения цАМФ; 2 — преждевременная индукция ГУАМТ печени крыс после введения им цАМФ (100 мкг на крысу). По оси абсцисс — возраст животных; Э — эмбрионы; Н — новорожденные, +1, +2, +3 — дни после рождения. По оси ординат — активность ГУАМТ (в мкмоль на 1 г влажной ткани).

динацетат-метилтрансферазу [6, 7], свидетельствует о том, что цАМФ опосредует действие этого гормона на синтез фермента.

Трудно оценить с точки зрения единого механизма действия роль инсулина в повышении активности ГУАМТ печени. Если исключить примесь глюкогона в препарате инсулина, то прямое стимулирующее влияние инсулина на активность ГУАМТ печени кажется необычным феноменом этого гормона. По-видимому, каждый из двух панкреатических гормонов действует на индукцию ГУАМТ печени независимо друг от друга. Вместе с тем эффекты обоих гормонов могут быть взаимосвязаны на уровне избирательного синтеза ГУАМТ. Ясно, однако, что влияние глюкогона осуществляется через цАМФ-опосредуемую активацию синтеза фермента, в то время как инсулин может осуществлять свое действие на уровне транскрипции матричной ДНК или транспорта ДНК-подобной РНК из ядра в цитоплазму или путем активации неактивного фонда полирибосом.

Следует иметь в виду, что инсулин в наших экспериментах применялся в дозе, которая вызывает «гипогликемический стресс». Недавно было показано [78], что индуцированный инсулином «гипогликемический стресс» сопровождается повышением уровня глюкогона и цАМФ в плазме крови. Как выяснилось, это действие инсулина *in vivo* опосредовано  $\beta$ -адренергической стимуляцией и выбросом катехоламинов в кровь [78]. Возможно поэтому в наших опытах действие глюкогона спустя 1 ч после введения инсулина суммируется с высвобожденными из тканей катехоламинами и как конечный результат наблюдается максимальная стимуляция ГУАМТ печени через посредство цАМФ.

*Роль цАМФ и глюкогона в постнатальной активации ГУАМТ печени крыс.* Контроль ГУАМТ печени цАМФ наиболее наглядно проявляется на примере постнатальной активации фермента. На рис. 2 видно, что активность ГУАМТ печени крыс обнаруживает резкое повышение начиная со 2-го дня постнатального развития крыс. Максимальное повышение активности наблюдается на 3-й день после рождения.

Внутрибрюшинное введение однократным крысятам цАМФ в дозе 100 мкг на крысу вызывает преждевременное повышение активности ГУАМТ (см. рис. 2). Подобно цАМФ, стимулирующее действие на активность ГУАМТ печени крыс оказывает глюкогон и дибутирил-цАМФ.

Преждевременное повышение активности ГУАМТ в печени крыс под действием цАМФ может объясняться активацией образованного, но еще неактивного фермента или быстрым увеличением скорости синтеза фермента вследствие укорочения лаг-фазы перед началом повышения. Эффекты глюкогона и цАМФ на активность ГУАМТ *in vivo* коррелируют. Сходным образом действует и дибутирил-цАМФ. Интересно отметить, что ингибитор синтеза белка пуромидин не блокирует повышение активности фермента, вызванное цАМФ *in vivo*.

*Стимулирующее влияние глюкогона, адреналина и кофеина на активность ГУАМТ печени и поджелудочной железы крыс in vitro.* Активность фермента в разрушенных клеточных препаратах — гомогенатах и суспензиях ткани печени — повышается под действием глюкогона и адреналина (эпинефрина) *in vitro*. Активность фермента заметно повышается в ответ на добавление глюкогона в концентрации от  $10^{-9}$  до  $10^{-7}$  М и адреналина в концентрации от  $10^{-7}$  до  $10^{-5}$  М. Возможно, что повышение активности ГУАМТ в гомогенатах печени в присутствии гормонов является следствием активации фермента, а не синтеза *de novo*.

Способность гормонов стимулировать активность ГУАМТ в разрушенных клеточных препаратах *in vitro* наблюдается в опытах не только с гомогенатами печени, но и с гомогенатами и суспензиями поджелудочной железы. Инкубация суспензии ткани поджелудочной железы крыс с S-аденозилметионином и гуанидинуксусной кислотой в присутствии адреналина (0,01—0,05 мкмоль в пробе) в среднем в 2 раза увеличивает активность ГУАМТ.

Стимуляция ГУАМТ в разрушенных клеточных препаратах демонстрируется *in vitro* в опытах с гомогенатами печени, инкубируемыми в присутствии кофеина (рис. 3). Метилксантины (кофеин, теофиллин) ингибируют цАМФ-фосфодиэстеразную активность [40, 41] и этим предотвращают гидролиз цАМФ; пул цАМФ в клетке возрастает. На рис. 3 видно, что активность ГУАМТ печени в присутствии кофеина ( $10^{-5}$  М) увеличивается в 5 раз.

Предпринятая нами попытка обнаружить стимуляцию креатинсинтезирующего фермента в печени и поджелудочной железе крыс при инкубации ферментных препаратов с цАМФ не увенчалась успехом. В концентрации от  $10^{-8}$  до  $10^{-2}$  М цАМФ не влияет на активность

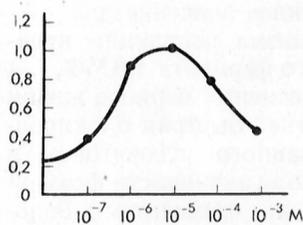


Рис. 3. Влияние кофеина на активность ГУАМТ в гомогенате печени крыс *in vitro*.

По оси абсцисс — концентрация кофеина в пробах. По оси ординат — активность фермента (в мкмоль на 1 г влажной ткани за 2 ч).

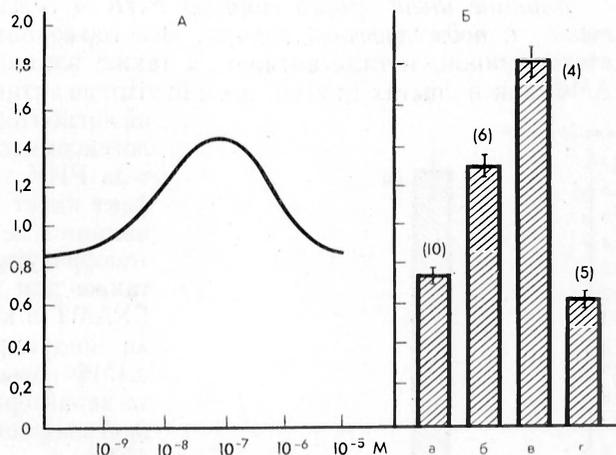


Рис. 4. Влияние кофеина на активность ГУАМТ в гомогенате поджелудочной железы крыс [6, 7].

А — зависимость активности фермента от концентрации кофеина в пробах; Б — влияние олигомицина на эффект кофеина, а — контроль; б — кофеин  $10^{-7}$  М; в — кофеин и  $Mg^{2+}$  5 мМ; г — кофеин,  $Mg^{2+}$  и олигомицин (2 мкг/мл). По оси абсцисс — концентрация кофеина. По оси ординат — активность фермента (в мкмоль на 1 г влажной ткани за 4 ч).

панкреатической ГУАМТ *in vitro* или даже ингибирует активность фермента.

Однако инкубация суспензии поджелудочной железы крыс в среде, содержащей  $10^{-9}$ — $10^{-6}$  М кофеин, приводит к увеличению активности фермента с максимумом при концентрации кофеина  $10^{-7}$  М (рис. 4, А). Следует отметить, что суспензии или гомогенаты готовили из поджелудочных желез крыс, подвергнутых ПОЖП, т. е. в присутствии аккумулярованного гормона. Поэтому, возможно, концентрация метилксантина, необходимая для максимальной стимуляции панкреатического фермента, оказалась на 2 порядка меньше ( $10^{-7}$  М), чем для фермента из гомогената печени интактных крыс ( $10^{-5}$  М).

Добавление 5 мМ  $Mg^{2+}$  в инкубационную среду, содержащую  $10^{-7}$  М кофеин, дополнительно увеличивает образование креатина из S-аденозилметионина и гуанидинуксусной кислоты, а добавление ингибитора синтеза АТФ олигомицина полностью подавляет активацию ГУАМТ кофеином и  $Mg^{2+}$  (рис. 4, Б). Это доказывает, что активация ГУАМТ *in vitro* требует АТФ. Известно, что одним из каналов использования цАМФ является активация цАМФ-зависимой протеинкиназы, фосфорилирующей белки путем переноса фосфата с АТФ [79—82].

На основании изложенного можно предположить, что механизм активации креатинсинтезирующего фермента цАМФ имеет в качестве опосредуемой стадии участие цАМФ-зависимой протеинкиназы:



*Влияние ингибиторов синтеза РНК и белка на активацию ГУАМТ печени и поджелудочной железы.* Все гормональные эффекты глюкогона, катехоламинов, метилксантинов, а также влияние цАМФ или дибутирил-цАМФ как в опытах *in vivo*, так и *in vitro* на активность ГУАМТ блокируются ингибитором синтеза белка — циклогексимидом или ингибитором синтеза РНК актиномицином D. Этот факт имеет важное значение для понимания механизма регуляции креатинобразующего фермента цАМФ, а также для выяснения периода жизни ГУАМТ в клетке. Быстрая блокировка индуцированного глюкогоном и цАМФ повышения активности фермента характерна для ферментов с большой скоростью «оборота» в клетке [83].

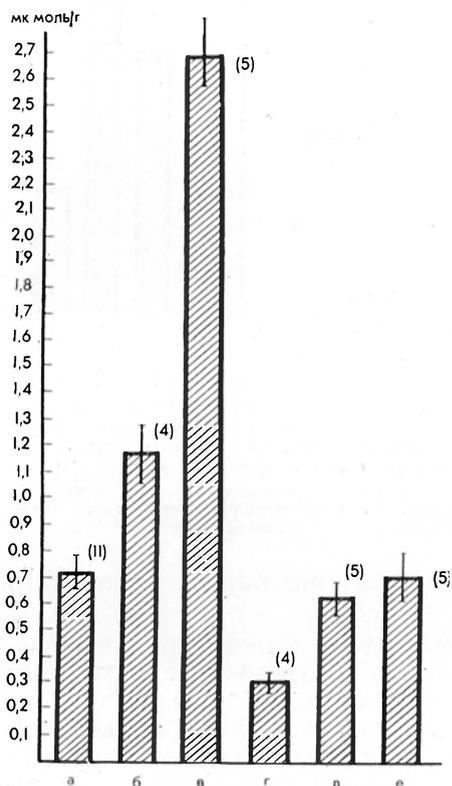


Рис. 5. Влияние комбинированного введения ХГТГ и дибутирил-цАМФ, циклогексимида, актиномицина и теофиллина на активность ГУАМТ семенников крыс [10].

а — контроль; б — введение в течение 5 дней ХГТГ; в — введение на 6-й день одновременно с ХГТГ дибутирил-цАМФ; г — то же + введение циклогексимида; д — то же + введение актиномицина; е — введение на 6-й день одновременно с ХГТГ теофиллина. По оси ординат — активность фермента (в мкмоль).

и, очевидно, участвует в регуляции ферментов семенников.

На рис. 5 видно, что после однократной внутрибрюшинной инъекции дибутирил-цАМФ активность ГУАМТ под влиянием ХГТГ резко возрастает. Это повышение предотвращается введением циклогексимида и актиномицина.

Роль цАМФ в регуляции биосинтеза креатина в ткани семенников: АМФ-опосредуемая стимуляция ГУАМТ хориональным и гонадотропным гормоном. Если глюкогон и адреналин активируют ГУАМТ в печени и поджелудочной железе через посредство цАМФ [2, 6], то в семенниках крыс циклический нуклеотид выполняет функцию «второго посланника» хорионального гонадотропного гормона (ХГТГ) [10].

Изотопными исследованиями была показана способность семенников крыс к синтезу креатина [84]. Известно, что ХГТГ человека специфически связывается с рецептором в гомогенате семенников и тестикулярной интерстициальной ткани крыс [85, 86] и, стимулируя аденилциклазу, вызывает увеличение продукции цАМФ [87—89]. Последний как «второй посредник» не только приводит к усилению внутриклеточного синтеза стероидов [90], но

и, очевидно, участвует в регуляции ферментов семенников.

Известно, что ХГТГ человека специфически связывается с рецептором в гомогенате семенников и тестикулярной интерстициальной ткани крыс [85, 86] и, стимулируя аденилциклазу, вызывает увеличение продукции цАМФ [87—89]. Последний как «второй посредник» не только приводит к усилению внутриклеточного синтеза стероидов [90], но

В опытах *in vitro* при инкубации гомогенатов семенников крыс с S-аденозилметионином и гуанидинуксусной кислотой в присутствии ХГТГ последний не только не стимулирует, но даже подавляет активность ГУАМТ [10]. Нечувствительность тестикулярной ГУАМТ к ХГТГ в гомогенатах из цельной ткани семенников, возможно, объясняется тем, что процедура гомогенизации могла нарушить целостность мембраносвязанной аденилциклазной системы или системы проведения гормонального сигнала. Подобная картина утраты способности отвечать образованием цАМФ на добавление гонадотропина наблюдалась в гомогенате семенников лосося [91].

Теофиллин, инъекцированный крысам в дозе 6,2 мг, также подавляет увеличение активности ГУАМТ семенников, вызванное ХГТГ (см. рис. 5). Эти данные согласуются со сведениями о способности метилксантинов подавлять цАМФ-опосредуемую стимуляцию стероидогенеза в семенниках [88, 92].

Полученные данные показывают, что ХГТГ стимулирует ГУАМТ семенников крыс *in vivo* через посредство цАМФ.

*Стимулирующее влияние норадреналина *in vitro* на активность ГУАМТ в эпифизе млекопитающих: роль цАМФ.* Гомогенаты эпифиза неполовозрелых и молодых крыс (20—25 дней; 30—32 дня) имеют высокую активность ГУАМТ, сравнимую с активностью фермента в печени и поджелудочной железе взрослых крыс [11]. Исходя из данных о том, что адренергический нейротрансмиттер — норадреналин, добавленный к гомогенату ткани эпифиза крыс, повышает активность аденилциклазы и содержание цАМФ [93], можно было ожидать, что ГУАМТ эпифиза крыс контролируется системой норадреналин — цАМФ.

Известно, что аденилциклаза присутствует в эпифизе крыс в более высокой концентрации по сравнению с другими отделами мозга и активируется катехоламинами [93, 94].

Инкубация гомогенатов крысиных и бычьих эпифизов с S-аденозилметионином и гуанидинуксусной кислотой в присутствии норадреналина ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$  M) увеличивает активность пинеальной ГУАМТ [9, 11]. Стимуляция норадреналином ГУАМТ из эпифизов крупного рогатого скота предотвращается при одновременном внесении в инкубационную среду циклогексимида и пуромидина [11].

Стимулирующее действие норадреналина и, возможно, других катехоламинов осуществляется через посредство цАМФ, так как аденилциклазная система эпифиза в определенных чертах сходна с адренергическим рецептором [94].

Введение крысам адреналина (эпинефрина) и теофиллина вызывает повышение активности ГУАМТ в эпифизе. Аналогичный эффект вызывает введение самого цАМФ. В то же время введение норадреналина не приводит к повышению активности ГУАМТ в эпифизе крыс. Вопрос о том, почему норадреналин оказывает стимулирующее влияние на активность ГУАМТ *in vitro* и не оказывает никакого влияния *in vivo*, неясен. Известно, однако, что развитие толерантности по отношению к пирокатехоламинам (изопротеренолу) в эпифизе крыс *in vivo* связано с индукцией фосфодиэстеразы и со снижением реактивности аденилциклазы [95, 96].

Таким образом, изучение специфичности действия различных пептидных гормонов и нейротрансмиттеров на активность ГУАМТ из различных органов показало, что активация фермента этими гормонами в тканях-мишенях является специфическим органотропным свойством соответствующего гормона, который вызывает стимуляцию креатининообразования в каждой ткани через цАМФ-опосредуемую активацию (глюкагон и адреналин — печень, секретин и адреналин — поджелудочная железа, хориональный гонадотропин — семенники, норадреналин — эпифиз) [9].

Однако поскольку главным методом синтеза креатина у млекопитающих является печень [33, 61], регуляция ГУАМТ печени глюкагоном и адреналином через посредство цАМФ имеет принципиально важное физио-

логическое значение. Анализ имеющихся в литературе данных по механизму действия глюкагона и адреналина на клетки печени, а также результаты наших собственных исследований позволили нам схематически изобразить механизм передачи информации с этих гормонов на биосинтез креатина у млекопитающих (рис. 6).

Глюкагон и адреналин стимулируют аденилциклазу плазматических мембран клеток печени и вызывают повышение концентрации цАМФ внутри клетки печени. Кофеин и теофиллин, предотвращая распад цАМФ до 5'-АМФ, увеличивают время жизни цАМФ в клетке или повышают его эн-

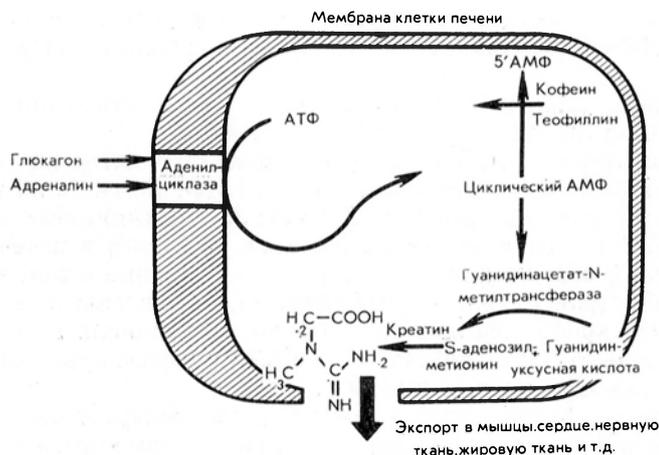


Рис. 6. Схема цАМФ-опосредованного влияния глюкагона и адреналина на биосинтез креатина в печени млекопитающих.

догенную концентрацию. цАМФ повышает активность ГУАМТ в печени и продукцию креатина. Мобилизуемый креатин поступает в кровь и утилизируется клетками мышц, сердца, нервной и жировой ткани с образованием фосфорилкреатина, пригодного для АТФ-генерирующих процессов.

*Нарушение цАМФ-опосредуемой гормональной регуляции ГУАМТ при наследственной мышечной дистрофии.* Креатинурия является ярким биохимическим симптомом мышечных дистрофий [97]. Спонтанная экскреция эндогенного креатина дала основание сформулировать концепцию «креатинурового диабета» по аналогии с понятием «сахарный диабет».

В настоящее время еще неясно, является ли креатинурия при наследственной мышечной дистрофии нарушением внутриклеточного синтеза креатина или дефектом проницаемости мембран мышечных клеток. В связи с этим представляло интерес выяснить возможное нарушение гормонального контроля кретинообразующего фермента ГУАМТ печени при наследственной мышечной дистрофии, в частности нарушением регуляции системой глюкагон — цАМФ.

Опыты были выполнены на мышцах мутантной линии 129/Re-dy с наследственной мышечной дистрофией.

Оказалось, что ткань печени мышей с наследственной мышечной дистрофией в прогрессирующей и терминальной стадиях заболевания характеризуется низкой базальной активностью ГУАМТ и снижением или полной утратой способности отвечать повышением активности фермента *in vitro* в ответ на добавление глюкагона и адреналина [98].

Этот дефект может быть связан: а) с недостаточностью рецепторного центра для глюкагона и адреналина или уменьшением их количества; б) с недостаточностью в системе проведения гормонального сигнала через мембрану; в) с недостаточностью гормоночувствительной аденилциклазы,

что приводит к снижению внутриклеточного уровня цАМФ; г) с ускорением высвобождения субстанции, инактивирующей глюкагон или адреналин.

*Заключение.* Связь между цАМФ и синтезом биологически важного креатина очевидна. Метаболическим участком, в котором действуют глюкагон, адреналин и другие гормоны через посредство цАМФ на продукцию креатина, предположительно является механизм N-метилирования гуанидинуксусной кислоты S-аденозилметионином.

Доказательства участия цАМФ в регуляции креатинсинтезирующего фермента ГУАМТ основываются на следующих критериях [53, 100].

Первое, стимуляция активности ГУАМТ под действием глюкагона и адреналина наблюдается в разрушенных клеточных препаратах печени и поджелудочной железы — гомогенатах и суспензиях. При этом глюкагон и адреналин способны вызывать повышение активности фермента как *in vitro*, так и *in vivo*. Время, в течение которого обнаруживаются эффекты глюкагона и адреналина на активацию ГУАМТ, согласуется с эффектами этих гормонов на аккумуляцию цАМФ.

Способность глюкагона и адреналина повышать активность ГУАМТ в гомогенатах коррелируют с многочисленными литературными сведениями о накоплении цАМФ в клеточных препаратах печени (гомогенатах, срезах, цельных клетках) при инкубации их с этими гормонами [101—105].

Второе, вещества, ингибирующие активность цАМФ-фосфодиэстеразы (теофиллин, кофеин), как *in vivo*, так и *in vitro* резко потенцируют действие глюкагона или секретина на активацию ГУАМТ печени и поджелудочной железы. При этом характерно, что в опытах *in vitro* дозы кофеина, которые стимулируют активацию фермента в гомогенате печени и поджелудочной железы ( $10^{-7}$  —  $10^{-5}$  М) были такими же, как и вызываемая гормонами (глюкагоном) продукция цАМФ.

Третье, дибутирил-цАМФ, введенный интактным крысам отдельно или совместно с теофиллином, в 2 раза повышает активность ГУАМТ в печени и поджелудочной железе. Эффект дибутирил-цАМФ на активацию ГУАМТ семенников крыс *in vivo* был особенно значительным после предобработки крыс ХГТГ.

Четвертое, 3'-АМФ, структурный аналог и антагонист цАМФ, вероятно, по конкурентному типу подавляет увеличение активности панкреатической ГУАМТ, индуцированное введением цАМФ. 3'-АМФ полностью блокирует секрецию ГУАМТ печенью и поджелудочной железой, вызванную секретинном, билоптином и их совместным введением с теофиллином.

Молекулярные основы цАМФ-опосредуемой гормональной активации ГУАМТ еще недостаточно выяснены. Не совсем ясен механизм различий в ответах ГУАМТ на действие гормона *in vitro* и *in vivo*, например в семенниках и эпифизе крыс.

Механизм, посредством которого цАМФ увеличивает синтез *de novo* ГУАМТ или активность уже имеющегося фермента, неясен. Однако, несомненно, этот механизм включает в качестве опосредуемой стадии участие цикло-3', 5'-АМФ-зависимой протеинкиназы [6, 7].

В общем, по-видимому, цАМФ проявляет в большинстве случаев способность стимулировать активацию синтеза *de novo* ГУАМТ, поскольку ингибитор ДНК-зависимого синтеза РНК-актиномицин D и ингибиторы синтеза белка — пурамицин и циклогексимид подавляют стимулированное гормонами и цАМФ повышение активности фермента в тканях-мишенях.

Постнатальная стимуляция ГУАМТ печени глюкагоном и цАМФ является, очевидно, примером активационного влияния гормона и нуклеотида на биосинтез креатина. Активация кажется здесь более предпочтительной, чем *de novo* синтез молекулы фермента, так как активация не ингибируется пурамицином.

цАМФ опосредует действие тканево-специфических гормонов на активацию ГУАМТ и продукцию креатина в соответствующей ткани, которая подвержена действию данного тканево-специфического гормона (глюкагон

и адреналин — печень; секретин и адреналин — поджелудочная железа; хориональный гонадотропный гормон — семенники; норадреналин — эпифиз).

На основании имеющихся данных можно предсказать, что, вероятно, и другие гормоны могут включаться в соответствующих тканях-мишенях в продукцию креатина через цАМФ-опосредуемую стимуляцию. Так, оказалось, что инкубация клеток мочевого пузыря жабы с альдостероном и вазопрессионом вызывает быстрое увеличение концентрации креатина [14]. В опытах с перфузируемым изолированным сердцем крысы показано, что после введения эпинефрина (адреналина) вслед за повышением уровня цАМФ в сердце с пиком 10 с наблюдается повышение содержания в клетках креатина с пиком через 25 с [13].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Karelin A. A., Mardashev S. R. — «Scand. J. clin. Lab. Invest.», 1972, v. 29, Suppl. 126, Abstracts 9.3. — 2. Карелин А. А., Мардашев С. Р. — «Вопр. мед. химии», 1972, № 6, с. 612. — 3. Карелин А. А. — В кн.: «Всероссийский биохимический съезд». 3-й. Рефераты научных сообщений. Рига, 1974, т. 2, с. 53, Реф. 4.85. — 4. Debov S. S., Karelin A. A., Silaeva S. A. et al. — «Thesis of plenary lectures. III Sympos. on regulation of sell metabolism». Friedrichroda, 1975. — 5. Karelin A. A. — «Thesis III Sympos. on regulation of cell metabolism». Friedrichroda, 1975. — 6. Карелин А. А., Мардашев С. Р. — «Биохимия», 1976, т. 41, с. 316. — 7. Карелин А. А., Мардашев С. Р. — Там же, 1976, т. 41, с. 259 (англ. транск.) — 8. Карелин А. А. — «Успехи совр. биол.», 1976, т. 81, № 3, с. 397. — 9. Карелин А. А. — В кн.: «Всероссийский симпозиум «Циклические нуклеотиды». Тезисы докладов, Красноярск, 1976, с. 11—12. — 10. Карелин А. А., Мардашев С. Р. — «Пробл. эндокринолог.», 1977, № 1, с. 79. — 11. Карелин А. А. — «Биохимия», 1977, т. 42, с. 833—838. — 12. Карелин А. А. — «Онтогенез», 1978, т. 9, № 2, с. 154—159. — 13. Williamson J. R. — «Molec. Pharmacol.», 1966, v. 2, p. 206. — 14. Handler J. S., Preston A. S., Orloff J. — «J. Steroid Biochem.», 1972, v. 3, p. 137. — 15. Jacobus W. E., Lehninger A. L. — «J. biol. Chem.», 1973, v. 248, p. 4803. — 16. Mommaerts W. E. H. M. — «Physiol. Rev.», 1969, v. 49, p. 427. — 17. Seryudarian M. W., Artaza L., Abbot B. C. — «J. molec. cell. Cardiol.», 1974, v. 6, p. 405. — 18. Saks V. A., Chernousova G. B., Gukovsky D. E. et al. — «Europ. J. Biochem.», 1975, v. 57, p. 273. — 19. Seryudarian M. W., Artaza L. — «J. molec. cell. Cardiol.», 1976, v. 8, p. 669. — 20. Seryudarian M. W., Abbot B. C. — Ibid. p. 741. — 21. Сакс В. А., Сеппет Э. К., Люлина Н. В. — «Биохимия», 1977, т. 42, с. 579. — 22. Seryudarian M. W., Artaza L., Abbott B. C. — «J. molec. cell. Cardiol.», 1974, v. 6, p. 405. — 23. Saks V. A., Lipina N. V., Smirnov V. N. et al. — «Arch. Biochem.», 1976, v. 173, p. 34. — 24. Walker J. B. — In: «Developmental and Metabolic Control Mechanisms and Neoplasia». Baltimore, 1965, p. 317. — 25. Walker J. B. — In: «Comparative Biochemistry of Arginine and Derivatives». (Ed.), G. E. M. Wolstenholme, M. Cameron, London, 1965, p. 43. — 26. Bitensky M. W., Gorman E. — «Progr. Biophys. molec. Biol.», 1973, v. 26, p. 409. — 27. Borsook H., Dubnoff J. W. — «J. biol. Chem.», 1947, v. 171, p. 363. — 28. Fidanza F. — «Biol. Soc. ital. Biol. sper.», 1948, v. 24, p. 114. — 29. Cohen S. — «Fed. Proc.», 1950, v. 9, p. 161. — 30. Cohen S. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 851. — 31. Cantoni G. L. — Ibid., v. 189, p. 745. — 32. Sutherland E. W., Rall T. W. — «Pharmacol. Rev.», 1960, p. 265—299. — 33. Borsook H., Dubnoff J. W. — «J. biol. Chem.», 1940, v. 132, p. 559. — 34. Sutherland E. W., Rall T. W. — «J. Am. Chem. Soc.», 1957, v. 79, p. 3608. — 35. Rall T. W., Sutherland E. W. — «J. biol. Chem.», 1958, v. 232, p. 1065. — 36. Sutherland E. W., Rall T. W. — Ibid., p. 1077. — 37. Rall T. W., Sutherland E. W., Berthet J. — Ibid., 1957, v. 224, p. 463. — 38. Markham R. — «Meth. Enzymol.», 1955, v. 3, p. 805. — 39. Khourana H. G., Tener G. M., Wright R. S. et al. — «J. Am. Chem. Soc.», 1957, v. 79, p. 430. — 40. Butcher R. W., Sutherland E. W. — «J. biol. Chem.», 1962, v. 237, p. 1244—1250. — 41. Cheung W. Y. — «Advanc. biochem. Pharmacol.», 1970, v. 3, p. 51. — 42. Kulka R. G., Sternlicht E. — «Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.», 1969, v. 61, p. 1123. — 43. Sutherland E. W., Oyler I., Butcher R. W. — «Recent Progr. Hormone Res.», 1965, v. 21, p. 623. — 44. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. — «Ann. Rev. Biochem.», 1968, v. 37, p. 149. — 45. Sutherland E. W., de Duve C. — «J. biol. Chem.», 1948, v. 175, p. 663. — 46. de Duve C., Berthet J. — «Reunion d'Endocrinologie», 1957, v. 4, p. 333. — 47. Docter — Hünicke G., Goetze T. — «Acta biol. med. germ.», 1968, Bd. 21, S. 495. — 48. Gaede K., Ferner H., Kastrup E. — «Klin. Wschr.», 1950, Bd. 28, S. 338. — 49. Ga-

ede K., Ferner H. — *Ibid.*, S. 621. — 50. Malhe P., Meyer V. — «C. R. Acad. Sci.», 1961, v. 253, p. 1861. — 51. Leclerq-Meyer V., Brisson G. R., Malaisse W. J. — «Nature», New Biol., 1971, v. 231, p. 248. — 52. Cantoni G., Vignos P. J. — «Meth. Enzymol.», 1955, v. 2, p. 260. — 53. Sutherland E. W., Robison G. A., Butcher R. W. — «Circulation», 1968, v. 37, p. 279. — 54. Feyertter F. — «Zbl. inn. Med.», 1938, Bd 59, S. 545. — 55. Borsook H. — «J. biol. Chem.», 1935, v. 110, p. 481. — 56. Rutten W. J., de Pont J. J. H. H. M. de, Bonting S. L. — In: «FEBS Meeting 8th Abstracts», 1972, Abstracts 154. — 57. Handler J. S., Butcher R. W., Sutherland E. W. et al. — «J. biol. Chem.», 1965, v. 240, p. 4524. — 58. Schramm M. — «Ann. Rev. Biochem.», 1967, v. 36, p. 307. — 59. Selinger Z., Schramm M. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 185, p. 395. — 60. Butcher R. W., Robison G. A., Hardman J. G. et al. — «Advanc. Enzyme Regulat.», 1968, v. 6, p. 357. — 61. Cantoni G. L., Vignos P. J. «J. biol. Chem.», 1954, v. 209, p. 647. — 62. Henion W. F., Sutherland E. W., Posternack T. — «Biochim. biophys. Acta», 1967, v. 148, p. 106. — 63. Menahan L. A., Hepp K. D., Wieland O. — «Europ. J. Biochem.», 1969, v. 8, p. 435. — 64. Klein D. C., Berg G. R. — «Advanc. Biochem. Psychopharmacol.», 1970, v. 3, p. 241. — 65. Mutt V., Jorpes J. F. — «Recent Progr. Hormone Res.», 1967, v. 23, p. 483. — 66. Kempen H. J. M., Pont J. J. H. H. M. de, Bonting S. L. — «Biochim. biophys. Acta», 1974, v. 370, p. 573. — 67. Robberecht P., Deschodt-Lanckman M., de Neef Ph. et al. — «Arch. int. Physiol. Biochim.», 1974, v. 82, p. 196. — 68. Case R. M., Laundry T. J., Scratchard T. — «J. Physiol. (Lond.)», 1969, v. 204, p. 45—46p. — 69. Vandenhede J. R., Keppens S., Wulf H. de — «FEBS Letters» 1976, v. 61, p. 213. — 70. Perkins J. P., Moore M. M. — «J. biol. Chem.», 1971, v. 264, p. 62—68. — 71. Bataille D., Rosselin G., Freychet P. — «Israel. J. med. Sci.», 1975, v. 11, p. 687—692. — 72. Pohl S. L., Birnbaumer L., Rodbell M. — «J. biol. Chem.», 1971, v. 246, p. 1849—1856. — 73. Grahame-Smith D. G., Butcher R. W., Nay R. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1967, v. 242, p. 5535—5541. — 74. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L. et al. — *Ibid.*, 1971, v. 246, p. 1877—1882. — 75. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L. et al. — «Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.», 1971, v. 68, p. 909. — 76. Krans H. M. J. — «Netherlands J. Med.», 1974, v. 17, p. 248. — 77. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L. — «Biochem. J.», 1971, v. 125, p. 58—59p. — 78. Brodows R. G., Ensink J. W., Campbell R. G. — «Metabolism», 1976, v. 25, p. 659. — 79. Walsh D. A., Krebs E. G., Reimann E. M. et al. — «Advanc. Biochem. Psychopharmacol.», 1970, v. 3, p. 265. — 80. Kuo J. P., Greengard P. — «Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.», 1969, v. 64, p. 1349. — 81. Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G. — «J. biol. Chem.», 1968, v. 243, p. 3763. — 82. Langan T. A. — «Science», 1968, v. 162, p. 579. — 83. Kenney F. T., Reel J. R., Hager C. B. et al. — In: «Regulatory Mechanism for Protein Synthesis in Mammalian Cell», Ed. A. San Pietro, M. L. Lamborg, J. T. Kenney. New York, 1968, p. 119—142. — 84. Koszalka T. R. — «Proc. Soc. exp. Biol.» (N. Y.), 1968, v. 128, p. 1130. — 85. Leidenberger F., Reichler L. E. — «Endocrinology», 1972, v. 91, p. 135. — 86. Catt K. J., Dufau M. L. — «Nature. New Biol.», 1973, v. 244, p. 219. — 87. Cooke B. A., van Beurden W. M. O., Rommerts F. F. G. et al. — «FEBS Letters». 1972, v. 25, p. 83. — 88. Rommerts F. F. G., Cooke B. A., van der Kemp J. W. C. M. et al. — *Ibid.*, 1972, v. 24, p. 251. — 89. Rommerts F. F. G., Cooke B. A., van der Molen H. J. — «J. Steroid Biochem.», 1974, v. 5, p. 279. — 90. Eik-Nes K. B. — «Resent Progr. Hormone Res.», 1971, v. 27, p. 517. — 91. Menon K. M. J., Smith M. — «Biochemistry (Wash.)», 1971, v. 10, p. 1186. — 92. Dufau M. L., Tsuruhara T., Watanabe K. et al. — «55th Ann. Meeting of the Endocrine Society», Illinois, 1973, PA—127, Abstract 157. — 93. Weiss B., Costa E. — «Science», 1967, v. 156, p. 1750. — 94. Weiss B., Costa E. — «J. Pharmacol. exp. Ther.», 1968, v. 161, p. 310. — 95. Oleshansky M. A., Neff N. H. — «Molec. Pharmacol.», 1975, v. 11, p. 552. — 96. Oleshansky M. A., Neff N. H. — «Life Sci.», 1975, v. 17, p. 1429. — 97. Milhorat A. T. — «Ass. Res. Nerv. Ment. Dis. Proc.», 1953, v. 32, p. 400. — 98. Карелин А. А. — «Вопр. мед. химии», 1976, № 5, с. 629. — 99. Rodbell M. — In: «Glucagon, Molecular Physiology. Clinical and Therapeutic Implications, Ed. P. Lefebvre, R. H. Unger. Oxford, 1972, p. 61. — 100. Sutherland E. W., Park C. R. — In: «Protein Phosphorylation in Control Mechanism». Ed. F. Huijning, E. Y. C. Lee. New York, 1973, v. 5, p. 1—30. — 101. Christoffersen T., Berg T. — «Acta endocr. (Kbh.)», 1973, v. 73, Suppl. 177, p. 282. — 102. Rosselin G., Freychet P., Fouchereau M. et al. — In: «Radioimmunoassay: Methodology and Applications in Physiology and in Clinical Studies». Stuttgart, 1974, p. 79. — 103. Miller E. A., Ingebretsen C., Clark J. F. et al. — «Proc. Soc. exp. Biol.» (N. Y.), 1974, v. 146, p. 186. — 104. Moxley M. A., Allen D. O. — «Hormone and Metab. Res.», 1975, v. 7, p. 330. — 105. Dich J., Gluud C. N. — «Acta physiol. scand.», 1976, v. 97, p. 457.

Б. П. Суринов

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ТКАНЯХ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ

Научно-исследовательский институт медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск

*С помощью электрофореза в агаровом геле исследован состав множественных форм кислой фосфатазы ряда органов и жидкостей крыс. Показано, что тканевая специфичность состава фракций фермента определяется соотношением активностей шести изоформ, различающихся по электрофоретической подвижности и чувствительности к некоторым ингибиторам.*

Интерес исследователей к кислой фосфатазе часто ограничивается ферментом простатической железы, что объясняется диагностической ценностью определения кислой фосфатазы в крови при раке простаты [1]. Между тем во многих тканях человека и подопытных животных обнаружены множественные формы этого фермента [2—4]. Внимание к кислой фосфатазе и ее изоформам усилилось в последние годы благодаря сведениями об участии лизосом, в которых преимущественно локализуется этот фермент, в механизмах злокачественной трансформации клеток тканей [5] и рассасывания опухолей [6], иммунных реакциях [7], интоксикациях [8, 9] и др.

В данной работе представлены результаты сравнительного электрофоретического исследования состава множественных форм кислой фосфатазы в жидкостях и некоторых органах крыс.

### М е т о д и к а

В работе использовали крыс линии Август массой 110—130 г, содержавшихся на стандартной диете. Электрофорезу в тонком слое 1,5% агарового геля с мидиналовым буфером рН 8,6 [10] подвергали надосадочную жидкость (105 000 g, центрифуга Spinko-1) гомогената тканей с трис-сахарозным буфером или 0,5% раствором дезоксихолата натрия [10], а также гемолизат эритроцитов, полученный в соотношении 1 : 1 с водой, сыворотку крови, лимфу грудного протока [12] и отделированный белковый 20-кратный концентрат мочи крыс самцов [13]. Относительную электрофоретическую подвижность фракций кислой фосфатазы определяли в сравнении с подвижностью альбумина сыворотки крови человека. Фракции кислой фосфатазы выявляли инкубацией электрофореграмм в растворе β-нафтилфосфата с прочным синим Б в ацетатном буфере рН 4,8. Чувствительность фракций к ингибиторам оценивали при инкубации электрофореграмм в растворах DL-тарtrate натрия (5 и 10 мМ), NaF (5 и 10 мМ) и формальдегида (0,5%) в течение 10 мин, а затем 1 ч в растворе субстрата с соответствующим ингибитором.

Результаты каждого наблюдения получены от 4—6 крыс, обследованных индивидуально.

### Р е з у л ь т а т ы

В тканях крыс с помощью электрофореза в агаровом геле обнаружено до 6 фракций кислой фосфатазы, различающихся по электрофоретической подвижности (рис. 1). Тканевая специфичность изоферментного состава кислой фосфатазы определяется главным образом соотношением активностей этих фракций. В то же время в тканях с низкой активностью кислой фосфатазы практически отсутствуют анодные фракции фермента. В сыворотке крови и лимфе кислая фосфатаза представлена одной малоактивной фракцией. В концентрате мочи состав фракций исследуемого фермента подобен экстракту почек по наиболее активным изоформам (см. рис. 1). В гемолизате эритроцитов с помощью данной методики кислая фосфатаза не выявлена.

Изоферментные спектры экстрактов тканей, полученных с помощью гомогенизирования в строго сопоставимых условиях с трис-сахарозным буфером или в присутствии дезоксихолата, существенно различаются (см. рис. 1). Как правило, состав фракций кислой фосфатазы экстрактов тканей, полученных в присутствии трис-сахарозного буфера в условиях,

падающих субклеточные частицы, что контролировалось с помощью электронной или фазово-контрастной микроскопии и иммунохимических методик [11], был беднее, чем в экстрактах, полученных в присутствии дезоксихолата.

Так, гомогенизирование печени с 0,5% раствором дезоксихолата натрия увеличивало активность фракций 2 и 3 и приводило к появлению фракции 1. Увеличение содержания фракций 2 и 3 после обработки дезоксихолатом наблюдалось также в экстрактах селезенки, лимфатических узлов и слизистой оболочки тонкой кишки, жировой околопочечной ткани и семенников. Обработка дезоксихолатом не влияла на состав фракций кислой фосфатазы в экстрактах головного мозга, поджелудочной железы и сердечной мышцы, в основном содержащих фракцию 6 (см. рис. 1).

Фракции 1, 2, 3 и 4 экстрактов печени, селезенки и слизистой оболочки тонкой кишки, полученных в присутствии дезоксихолата, были незначительно чувствительны к тартрату и NaF, в то время как

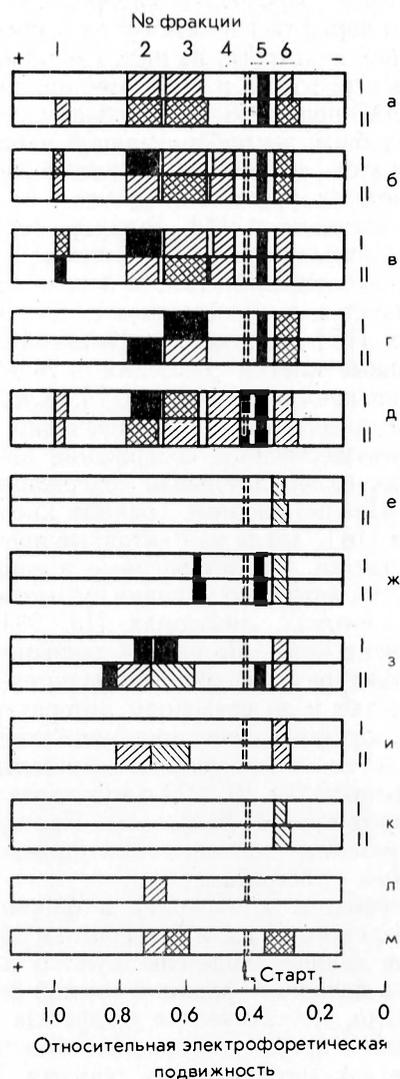


Рис. 1. Схемы электрофореграмм множественных форм кислой фосфатазы печени (а), селезенки (б), лимфатических узлов (в), почек (г), слизистой оболочки тонкой кишки (д), головного мозга (е), поджелудочной железы (ж), жировой ткани (з), семенников (и), сердечной мышцы (к), сыворотки крови (л) и мочи (м) крыс.

I — экстракт, полученный с помощью трис-сахарозного буфера; II — экстракт, полученный с помощью раствора дезоксихолата натрия. Здесь и на рис. 2 интенсивность штриховки фракций на схемах соответствует их активности.

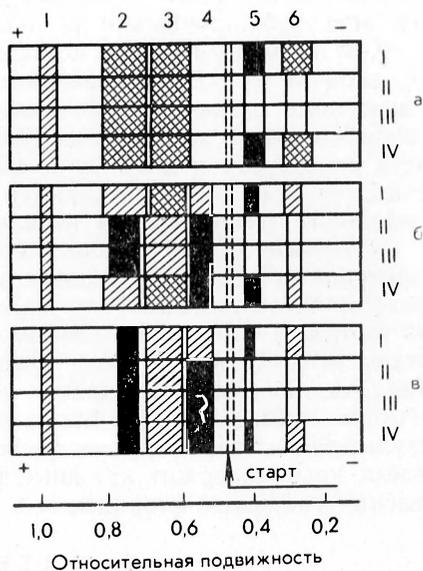


Рис. 2. Влияние ингибиторов на активность изоферментов дезоксихолатовых экстрактов печени (а), селезенки (б) и слизистой оболочки тонкой кишки (в) крыс.

I — контроль; II — в присутствии NaF (10 Мм); III — в присутствии DL-тартрата (10 мМ); IV — в присутствии формальдегида (0,5%).

фракции 5 и 6 существенно угнетались этими ингибиторами (рис. 2). Формальдегид практически не влиял на активность наблюдаемых фракций кислой фосфатазы.

Как видно из представленных данных, состав множественных форм кислой фосфатазы в жидкостях и органах крыс обусловлен набором шести фракций, активность которых существенно варьирует в каждом из исследованных тканей вплоть до полного отсутствия некоторых из них. По данным литературы, в печени крыс с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [2, 4, 14] или хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе [2] обнаруживалось 3—5 изоформ кислой фосфатазы. Подобный же набор фракций наблюдали и в других тканях крыс [4, 14]. При этом, так же как и в нашей работе, отмечалось повышение содержания анодных фракций фермента в органах, богатых ретикулоэндотелиальными элементами [4]. Высокое содержание кислой фосфатазы в клетках ретикулоэндотелиальной системы подтверждается и данными гистохимических наблюдений. Так, в печени кислая фосфатаза преимущественно локализуется в купферовских, но имеется также и в паренхиматозных клетках [15]. Высокой фосфатазной активностью обладают ретикулоэндотелиальные клетки селезенки и лимфатических узлов [16] и макрофаги эпителия канальцев почек [17]. Клетки ретикулоэндотелиальной системы богаты лизосомами, чем, очевидно, и объясняются высокая активность и преимущественное содержание анодных фракций кислой фосфатазы в органах со значительным содержанием клеток ретикулоэндотелиальной системы. Именно анодные фракции кислой фосфатазы содержатся в матриксе лизосом [18], тогда как катодные преобладают в мембранах этих субклеточных частиц. Представленные в нашей работе данные подтверждают сведения других авторов о наличии существенной активности кислой фосфатазы в микросомах, лизосомах [19, 20] и соединительнотканых элементах [20] печени крыс. По нашим данным, во всех этих субклеточных и тканевых структурах содержится фракция 6.

Как по данным наших исследований, так и по сведениям литературы [4], анодные фракции кислой фосфатазы, содержащие преимущественно в лизосомах ретикулоэндотелиальных клеток, относительно резистентны к ингибиторам. В то же время имеются данные [19, 21, 22] о чувствительности к тартрату и фториду именно лизосомальной фосфатазы. Противоречия, по-видимому, объясняются особенностями методических приемов, в частности различиями в использованных субстратах.

Чувствительность простатической фосфатазы к тартрату и фториду, а эритроцитарной — к формальдегиду используют [1] для диагностики рака предстательной железы. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что тартрат и фторид угнетают активность катодных фракций кислой фосфатазы многих тканей крыс. Следовательно, простатическая фосфатаза не уникальна по своим свойствам и появление в крови угнетаемой этими ингибиторами кислой фосфатазы может быть связано с другими тканями. По результатам электрофореза в полиакриламидном геле [14] предстательная железа крыс содержит катодные фракции кислой фосфатазы, в большой степени угнетаемые фторидом и в меньшей — тартратом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Подильчак М. Д. Клиническая энзимология. Киев, 1967, с. 158.
2. Varga T. — J. Histochem. Cytochem., 1961, v. 9, p. 564.
3. Lundih L. G., Allison A. C. — Biochim. biophys. Acta, 1966, v. 127, p. 527.
4. Канеко А., Идека Т., Опое Т. — Ibid., 1970, v. 222, p. 218.
5. Allison A. C., Mallicci L. — Nature, 1964, v. 203, p. 1024.
6. Филов В. А. — Вопр. онкол., 1970, № 7, с. 93.
7. Лямнерт И. М., Тодер В. А. — Бюлл. экспер. биол., 1970, № 2, с. 60.
8. Покровский А. А., Кравченко Л. В., Тутельян В. А. — Биохимия, 1971, № 4, с. 690.
9. Thorbecke G. J., Venasergaf V., Clarke D. A. — J. Histochem. Cytochem., 1961, v. 9, p. 392.
10. Суринов Б. П., Кашкин К. П., Бочкова Д. Н. и др. — Лабор. дело, 1970, № 4, с. 470.
11. Kashkin K. P. — Folia biol. (Praha), 1966, v. 12, p. 382.
12. Полушкина Э. Ф., Кашкин К. П., Карташова А. Л. и др. — Радиобиология, 1971, № 5, с. 679.
13. Суринов Б. П.,

- Кулиш Ю. С. — Мед. радиол., 1975, № 10, с. 43. — 14. Kitamura T. — J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., 1969, v. 17, p. 240. — 15. Essner E., Novikoff A. B. — J. biophys. biochem. Cytol., 1961, v. 9, p. 773. — 16. Barka T., Schaffner F., Popper H. — Lab. Invest., 1961, v. 10, p. 590. — 17. Straus W. — J. Cell. Biol., 1960, v. 20, p. 497. — 18. Покровский А. А., Николаева М. Я., Кравченко Л. В. и др. — Докл. АН СССР, 1973, т. 213, с. 469. — 19. Shibko S., Tarpeil A. L. — Biochim. biophys. Acta, 1964, v. 73, p. 76. — 20. Lundkvist U., Perlmann P., Eneku U. — Exp. Cell. Res., 1967, v. 47, p. 363. — 21. Neill M. W., Horner M. W. — Biochem. J., 1964, v. 92, p. 217. — 22. Nelson B. D. — Proc. Soc. exp. Biol. N. Y., 1966, v. 121, p. 998.

Поступила 12/Х 1977 г.

## ACID PHOSPHATASE: DISTRIBUTION IN TISSUES AND SOME PROPERTIES OF MULTIPLE FORMS OF THE ENZYME

B. P. Surinov

Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences, of the USSR, Obninsk

Composition of multiple forms of acid phosphatase was studied in some tissues and biological fluids of rat by means of electrophoresis in agar gel. The tissue specificity of the enzyme was determined by the ratio of its 6 isoforms, which were differentiated by electrophoretic mobility and by sensitivity towards some inhibitors.

УДК 612.35.015.32-06:612.8

И. К. Капинос

## ВЛИЯНИЕ ДЕНЕРВАЦИИ НА УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН В ПЕЧЕНИ

Кафедра анатомии человека Запорожского медицинского института

*Исследовали влияние смешанной денервации печени собак на активность глюкозо-6-фосфатазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, содержание гликогена в гепатоцитах и содержание сахара в крови. Гистохимическими методами установлено повышение активности ферментов и снижение содержания гликогена через 1—2 нед после операции. В последующие сроки наблюдения (1, 3, 6 мес и 1 год) активность ферментов и содержание гликогена в печени экспериментальных животных существенно не отличались от контроля. Содержание сахара в крови подопытных собак не отличалось от контроля во все сроки исследования (от 3 дней до 3 мес). На основании полученных результатов сделано заключение, что смешанная денервация вызывает незначительные и временные нарушения некоторых сторон углеводного обмена печени. Гликемическая функция печени при этом не нарушается.*

Регулирующее влияние центральной нервной системы на углеводную функцию печени не вызывает сомнений [1]. Однако при трансплантации печени в эксперименте и клинике, сопровождающейся ее денервацией, в крови реципиентов поддерживается нормальный уровень сахара. В специально предпринятых экспериментах по выяснению влияния денервации на некоторые стороны углеводного обмена получены противоречивые результаты. Разными авторами выявлено как значительное накопление гликогена [2, 3], так и значительное снижение его содержания вплоть до полного исчезновения [4]. Отмечено также резкое изменение активности глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Ф-азы) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), принимающих участие в регуляции углеводного обмена [5, 6]. Изменение структуры печеночных клеток и активности некоторых ферментов дало основание ряду авторов [7, 5] выдвинуть предположение о морфологической и функциональной дедифференцировке клеток денервированной печени и о возврате в них обменных процессов к эмбриональному типу. В настоящем исследовании поставлена задача изучить влияние денервации на некоторые стороны углеводного обмена в печени собак: активность Г-6-Ф-азы и Г-6-ФДГ, содержание гликогена в паренхиме печени и концентрацию сахара в крови.

## М е т о д и к а

Активность ферментов и содержание гликогена в паренхиме печени определяли гистохимически: Г-6-Ф-азу — по методу Чикуина в модификации Лилли [8], Г-6-ФДГ — по методу Хесс и соавт. [9], гликоген — с помощью ШИК-реакции [10] и по методу Беста [8] с ферментативным контролем амилазы слюны. Активность ферментов и содержание гликогена оценивали полуколичественным методом. Содержание сахара в крови определяли методом Хагедорна — Йенсена [11]. Гистохимические исследования выполнены на 23 подопытных и 11 контрольных беспородных собаках обоего пола и примерно одного возраста. Биохимические исследования проведены на 5 подопытных и 8 контрольных собаках. Смешанную денервацию печени осуществляли путем двустороннего удаления узлов чревного сплетения, перерезки ветвей печеночного нервного сплетения по общей печеночной артерии, пересечения переднего ствола блуждающих нервов под диафрагмой и рассечения листков малого сальника.

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

При гистохимическом исследовании Г-6-Ф-азы и Г-6-ФДГ, конкурирующих за глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), выявлено усиление их активности в паренхиматозных клетках печени через 1—2 нед после денервации. Спустя 1 мес и во все последующие сроки наблюдения (3, 6 мес и 1 год) активность вышеуказанных ферментов существенно не отличалась от контроля (рис. 1, см. на вклейке). Изменения локализации ферментов в печени экспериментальных животных по сравнению с контрольными не установлено.

При изучении содержания и локализации гликогена в гепатоцитах денервированной печени выявлено снижение его количества, наиболее четко выявляющегося через 2 нед после операции. Полного исчезновения гликогена ни в одном случае не наблюдалось. В этот же период отмечается выраженная неравномерность локализации гликогена в пределах дольки, а иногда и в рядом расположенных гепатоцитах. Отчетливо изменяется и характер его внутриклеточной локализации. В печени контрольных животных гликоген в виде мелких и средних гранул одинаковой величины равномерно заполняет цитоплазму гепатоцитов. После денервации отмечается неравномерность его локализации в пределах гепатоцита, вызванная в значительной степени выраженной вакуолизацией цитоплазмы. Отмечается неравномерность гранул, скопление их в крупные конгломераты. Изменения содержания гликогена и характера его локализации наиболее отчетливо проявляются при гистохимической окраске кармином по Бесту. При выявлении гликогена при помощи ШИК-реакции гистохимическая картина затухает, вываляется амилазоустойчивыми нейтральными мукополисахаридами. Через 1 мес после операции содержание гликогена в печени увеличивается, однако неравномерность его локализации в пределах дольки и в цитоплазме клеток еще сохраняется, но она уже менее выражена. В последующие сроки наблюдения (3 мес — 1 год) отмечается умеренное увеличение количества гликогена в печени экспериментальных животных по сравнению с контрольными без существенного различия в характере локализации (рис. 2, см. на вклейке). Следует отметить, однако, что как в печени интактных, так и в печени экспериментальных животных в поздние сроки после операции не всегда отмечается абсолютно равномерная локализация гликогена по препарату и в пределах дольки. Чаще выявляется умеренное преобладание гликогена в центре или по периферии дольки, отражающее функциональную неравнозначность различных отделов дольки печени. При очень высоком содержании гликогена он распределяется равномерно по препарату и в пределах дольки.

При биохимическом определении сахара в крови экспериментальных собак через 3, 7, 14, 30, 60 и 90 дней после денервации достоверных отличий от контроля не установлено ( $P > 0,1$ ).

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что изменение активности изученных ферментов углеводного обмена носит временный характер и сменяется нормализацией, наступающей через 1—3 мес после денервации. Усиление активности Г-6-Ф-азы и Г-6-ФДГ при одновремен-

ном снижении содержания гликогена свидетельствует о том, что Г-6-Ф в ранние сроки после денервации образуется преимущественно за счет распада гликогена. Нарушения углеводного обмена печени даже в начальные сроки после денервации выражены не настолько, чтобы вызвать нарушение гликемического гомеостаза, о чем свидетельствуют данные о содержании сахара в крови. Умеренное нарушение углеводного обмена в ранние сроки после денервации обусловлено, по нашему мнению, не специфическим влиянием отсутствия нервной импульсации, а главным образом нарушением внутрипеченочного кровообращения и развивающейся гипоксией, которая сопровождается снижением синтеза АТФ в митохондриях [12] и вызывает стимуляцию гликолиза. Энергетический дефицит в денервированных тканях приводит к увеличенному распаду гликогена и образованию Г-6-Ф с последующим усиленным расщеплением его по пентозо-фосфатному и гликолитическому путям. Активация пентозо-фосфатного цикла приводит также к усилению синтеза углеводных компонентов нуклеиновых кислот и НАДФ-Н<sub>2</sub>, необходимого для синтетических процессов. Поэтому усиление активности Г-6-ФДГ расценивается нами не как регрессивный признак упрощения обмена веществ в денервированной печени и возврата его к эмбриональному типу [5, 6], а как наиболее ранний признак репаративной регенерации поврежденной ткани. В более поздние сроки после денервации (1 мес — 1 год) отмечаются постепенное восстановление внутрипеченочной гемодинамики, а также адаптация клеток к новым условиям кровоснабжения, что сопровождается снижением распада углеводов, усилением процессов синтеза и накоплением гликогена в печени.

Таким образом, изменения активности некоторых ферментов углеводного обмена и количества гликогена в денервированной печени являются временными и обусловлены в первую очередь измененными условиями кровоснабжения. Но даже в этих условиях печень выполняет одну из специфических функций — поддержание сахара в крови на оптимальном уровне. Результаты исследования не подтверждают функциональной дедифференцировки денервированных клеток печени, по крайней мере относительно углеводного обмена. Вместе с тем полученные данные подтверждают необходимость и важность нервной регуляции рассматриваемой функции и должны быть расценены как поиски резервных возможностей органа для выполнения специфических функций при экстремальных воздействиях, в том числе и при его трансплантации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лейбсон Л. Г. Сахар крови. М.—Л., 1962. — 2. Медведева Н. Б. Медицинский ж., 1936, № 2, с. 315. — 3. Горбаткова И. Е., Ефимшин Н. С. — В кн.: Прибалтийская конференция центральных науч.-исслед. лабораторий мед. интов и факультетов. Материалы. Каунас, 1-я, 1965, с. 96. — 4. Астахова А. М. — Арх. анат., 1965, № 9, с. 70. — 5. Ильин В. С. — В кн.: Молекулярная биология. М., 1964, с. 323. — 6. Шаыгина К. И. — *Вопр. мед. химии*, 1966, № 3, с. 258. — 7. Григорьева Т. А. — Арх. анат., 1959, № 3, с. 3. — 8. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., 1969, с. 294, 461. — 9. Hess R., Scarpelli D. G., Pearse A. E. — *Nature*, 1958, v. 181, p. 1531. — 10. Hotchkiss R. — *Arch. Biochem.*, 1948, v. 16, p. 131. — 11. Предтеченский Б. Е., Боровская В. М., Марголина Л. Т. — *Руководство по клиническим лабораторным исследованиям*. М., 1960, с. 158. — 12. Нейфах С. А. — В кн.: *Проблемы теоретической медицины*. Л., 1968, с. 117.

Поступила 21/Х 1977 г.

#### EFFECT OF DENERVATION ON CARBOHYDRATE METABOLISM IN LIVER TISSUE

I. K. Kapinosov

Chair of Human Anatomy, Medical School, Zaporozhie

Activities of glucose-6-phosphatase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and content of glycogen in liver as well as content of sugar in blood were studied after denervation of dog liver tissue. Activities of these enzymes were increased and content of glycogen in hepatocytes

was decreased within 1-2 weeks after the denervation. Within a month the enzymatic activities and content of glycogen in liver tissue approached the control levels; these patterns were similar to control ones within the subsequent periods of examination (3-months - 1 year). Content of sugar in blood was the same within all the periods of study (3 days - 3 months).

УДК 615.357.631.017:615.272.6.015.42:612.35

В. Н. Сыров, А. Г. Курмуков, А. Д. Сахибов

## ВЛИЯНИЕ ТУРКЕСТЕРОНА И НЕРОБОЛА НА АКТИВНОСТЬ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ

Лаборатория фармакологии Института химии растительных веществ АН Узбекской ССР, Ташкент

*Введение мышам-самцам фитостероидна туркестерона (0,5 мг/100 г) или анаболического стероидного препарата неробола (1 мг/100 г) стимулировало биосинтез белка в печени животных в опытах *in vivo* и *in vitro*, что связано с увеличением функциональной активности полирибосом и повышением скорости синтеза белковых молекул. Актиномицин D, снимая эффект стимуляции синтеза белка в печени мышей, получивших неробол, не оказывает существенного действия при введении туркестерона.*

В последние годы стало известно, что экдизоны широко распространены в растительном мире [1]. Эти соединения интересны тем, что обладают не только специфической активностью гормонов линьки и метаморфоза насекомых, но и оказывают определенное воздействие на те типы животных, которые неспособны к их эндогенному продуцированию [2]. Особого внимания заслуживает биологическая активность экдизонов по отношению к млекопитающим. Так, в работах последних лет [3—5] установлено, что многие экдизоны, так же как и производные мужских половых гормонов (хлортестостерон и метиландростендиол), при введении экспериментальным животным оказывают определенное анаболическое действие.

Известно, что в основе эффекта многих стероидных анаболических препаратов лежит их способность ускорять процессы синтеза белка в тех или иных органах и тканях [6, 7].

Задачей данного исследования являлось сравнительное изучение влияния фитостероидна туркестерона и неробола на активность процессов синтеза белка в печени мышей.

### М е т о д и к а

Использованный в опытах туркестерон был выделен в Институте химии растительных веществ АН Узбекской ССР из местного растения *Ajuga turkestanica* (Rgl.) [8].

Эксперименты проведены на беспородных мышам-самцам массой 18—22 г. Туркестерон в дозе 0,5 мг/100 г и неробол в дозе 1,0 мг/100 г вводили однократно внутривенно в зависимости от цели исследования за 1, 2, 4 и 8 ч до декапитации. В опытах с актиномицином D антибиотик применяли за 30 мин до введения испытуемых препаратов в дозе 2 мг/кг. Полирибосомы из печени мышей выделяли по описанному в литературе методу [9] с некоторыми изменениями [10]. Функциональную активность полирибосом исследовали в бесклеточной системе синтеза белка по описанию Угаровой и соавт. [11]. Полисомный материал анализировали в градиенте плотности сахарозы 10—50% с подслоем 2,3 М сахарозы. На градиент наносили 5—7 мг полисом в объеме 0,5 мл и центрифугировали при 26 000 об/мин в роторе SW-30 на препаративной ультрацентрифуге VAC-601 в течение 120 мин. После этого градиенты распределяли по 20 капель в пробирки, добавляли 2,0 мл воды и спектрофотометрировали при 260 нм.

В опытах *in vivo* использовали смесь  $^{14}\text{C}$ -лейцина и валина. Меченые аминокислоты вводили мышам по 10 мкКи за 10 мин до декапитации, после которой печень немедленно помещали в жидкий азот. Включение  $^{14}\text{C}$ -аминокислот в тотальные, завершённые и незавершённые белки гомогената печени, а также активность кислоторастворимой фракции определяли по описанию Абакумовой и соавт. [12]. Радиоактивные образцы осаждали добавлением равного объема 10% ТХУ на холоду, наносили на миллиметровые фильтры «Синпор-2», промывали 50 мл 5% ТХУ и сушили под лампами накаливания. Радиоактивность образцов измеряли на газопротоочном счетчике «Протока». Время синтеза средней полипептидной цепи рассчитывали по формуле:

$$t_c = 2t_m \cdot DP_{pp} \text{ для } t_m \geq t_c,$$

где  $t_m$  — время мечения полипептида;  $DP_{pp}$  — доля радиоактивности растущих пептидов [13].  $t_m$  рассчитывали по формуле:  $t_m = t_{мж} + t_{осб} - t_{лаг}$ , где  $t_{мж}$  — время с момента введения метки до погружения печени в жидкий азот;  $t_{осб}$  — время с момента погружения печени в жидкий азот до полной остановки синтеза белка;  $t_{лаг}$  — время с момента введения метки до попадания ее на внутриклеточный пул печени. По литературным данным,  $t_{осб} - t_{лаг}$  равно  $\sim 34$  с [13],  $t_{мж}$  в каждом конкретном случае определяли по секундомеру.

## Результаты и обсуждение

Однократное введение туркестерона и неробола увеличивает радиоактивность белков печени в 1,9—2 раза (табл. 1). Активность кислоторастворимой фракции при этом не меняется, следовательно, концентрация  $^{14}\text{C}$ -аминокислот во внутриклеточном фонде во всех случаях эксперимента одинакова, и стимуляция включения метки в кислотонерастворимую фракцию свидетельствует об активации белкового синтеза в печени мышей.

Для выяснения вопроса о локализации действия изучаемых веществ на белоксинтезирующую систему мы поставили перекрестные опыты *in vitro* с полисомами и клеточным соком, полученными из печени контрольных и подопытных животных.

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что стимуляция синтеза белка в бесклеточной системе является результатом изменений только в полирибосомальном аппарате клеток печени. Так, при тестировании «опытных» полисом с клеточным соком, полученным из печени контрольных животных, наблюдалось четкое повы-

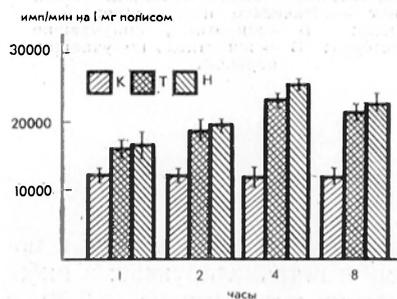


Рис. 1. Влияние туркестерона (Т) и неробола (Н) на включение  $^{14}\text{C}$ -аминокислот в белок в бесклеточной системе из печени мышей по сравнению с контролем (К).

шение функциональной активности полирибосом, наиболее выраженное через 4 ч после введения препаратов (рис. 1).

Активность клеточного сока в проведенных экспериментах существенно не изменялась, однако следует отметить, что в системе из полирибосом и

Таблица 1

Радиоактивность общих белков гомогената и кислоторастворимой фракции печени мышей в опытах *in vivo* ( $M \pm m$ )

	Радиоактивность, имп/мин на 1 г печени	
	общих белков гомогената	кислоторастворимой фракции
Контроль	138 466 ± 2447	70 266 ± 3816
Введение туркестерона	264 512 ± 6012	72 221 ± 1838
Введение неробола	284 120 ± 5479	71 088 ± 7876

Таблица 2

Результаты перекрестных опытов с фракциями контрольных и опытных белоксинтезирующих систем ( $M \pm m$ )

Полисомная фракция	Клеточный сок	Включение $^{14}\text{C}$ -аминокислот, имп/мин на 1 мг полисом
Контрольная	Контрольный	12 212 ± 374
	«Туркестероновый»	13 044 ± 481
	«Нероболовый»	13 407 ± 597
«Туркестероновая»	Контрольный	23 133 ± 301
	«Туркестероновый»	24 395 ± 271
«Нероболовая»	Контрольный	25 561 ± 131
	«Нероболовый»	29 181 ± 430

клеточного сока печени животных, получавших неробол, синтез белка повышался на 14% ( $P < 0,001$ ). При исследовании полирибосомного профиля клеток в норме и под действием препаратов (рис. 2) оказалось, что стимуляция функциональной активности полисомов клеток печени под действием туркестерона не сопровождается существенными изменениями распределения рибосом в градиенте плотности сахарозы. Введение неробола приводит

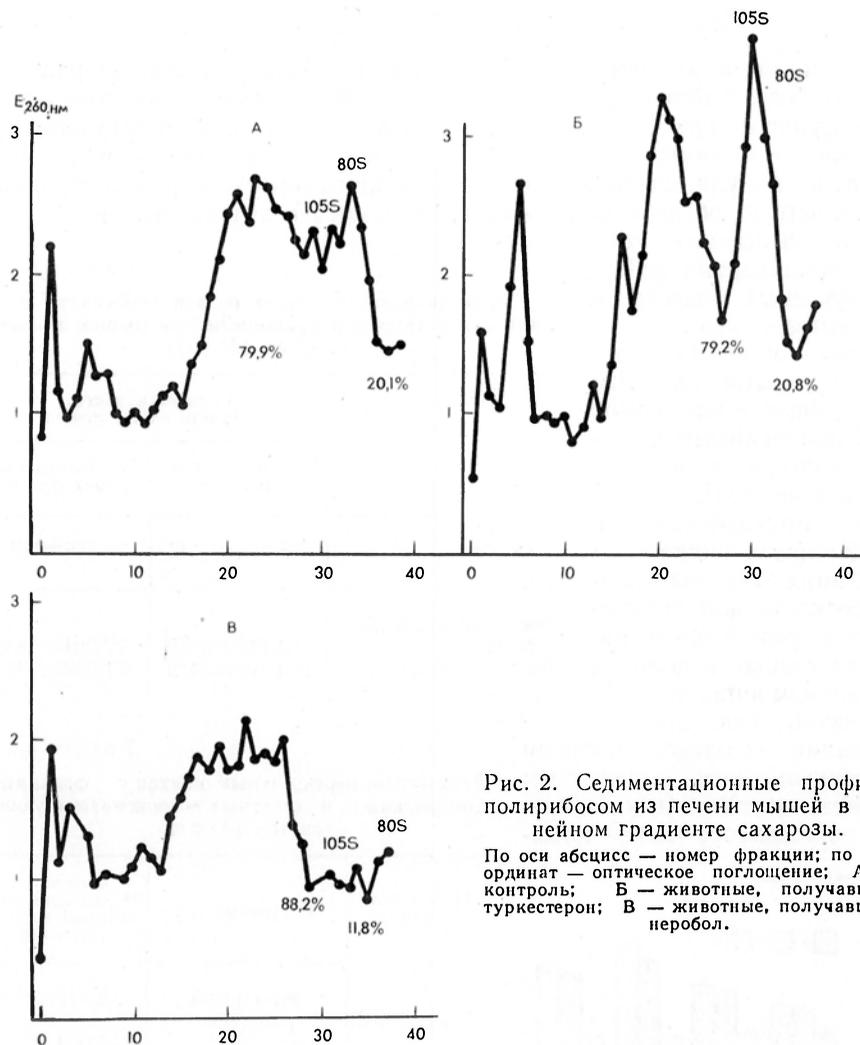


Рис. 2. Седиментационные профили полирибосом из печени мышей в линейном градиенте сахарозы.

По оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат — оптическое поглощение; А — контроль; Б — животные, получавшие туркестерон; В — животные, получавшие неробол.

к увеличению доли полирибосом и уменьшению содержания димеров и мономеров. Соотношение между транслирующими и нетранслирующими рибосомами в контроле составляет 3,98, при введении туркестерона — 3,80, а при использовании неробола оно увеличивается до 7,48.

Стимуляция функциональной активности и изменение полирибосомного профиля, особенно после применения неробола, позволяют думать, что при введении препаратов может активироваться транскрипция и усиливаться синтез иРНК либо эффект препаратов связан с их влиянием на трансляционные процессы. Так, с возрастанием частоты инициации может происходить мобилизация нетранслирующих рибосом, вследствие чего также возможны указанные изменения в полирибосомном профиле клеток печени после введения неробола.

В связи с этим представляло интерес измерение скорости синтеза белковых молекул в контроле и после введения препаратов. Исследования показали, что под действием препаратов время синтеза средней белковой молекулы уменьшается (табл. 3). Таким образом, в конечном итоге оба препарата усиливают синтез белка в печени путем ускорения синтеза белковых молекул.

Т а б л и ц а 3

Включение  $^{14}\text{C}$ -аминокислот в тотальные, завершённые, растущие на полисомах пептиды печени мышей под действием туркестерона и неробола в опытах *in vivo* ( $M \pm m$ )

	Радиоактивность полипептидов, имп/мин на 1 г печени			Доля радиоактивности растущих полипептидов	Время синтеза полипептида, с *
	тотальных	завершённых	растущих		
Контроль	98 325 ± 1449	92 383 ± 1251	5942	0,0604	84
Введение туркестерона	162 523 ± 1777	158 533 ± 1383	3990	0,0245	33
Введение неробола	168 135 ± 1460	165 544 ± 2284	2591	0,0154	21

\*  $t_{\text{мж}}$  в наших условиях в контроле равнялось 663 с, у животных, получавших туркестерон, — 643 с, у получавших неробол — 647 с.

Опыты с ингибитором синтеза ДНК-зависимой РНК актиномицином D (табл. 4) показали, что он почти полностью снимает эффект неробола, а на стимулирующее действие туркестерона заметного влияния не оказывает. В связи с этим можно предположить, что в основе стимулирующего действия туркестерона и неробола на синтез белка в печени лежат различные механизмы. Действие туркестерона, очевидно, не связано с влиянием на процессы транскрипции, а скорее является следствием активации процессов синтеза белка, происходящих в цитоплазме, т. е. на уровне трансляции.

Т а б л и ц а 4

Влияние актиномицина D на стимуляцию синтеза белка туркестероном и нероболом в печени мышей ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Радиоактивность общего белка, имп/мин на 1 мг печени	Удельная радиоактивность полирибосом, имп/мин на 1 мг
Контроль (+ актиномицин D)	136 791 ± 3849	397 ± 29,7
Актиномицин D + туркестерон	249 770 ± 4275	743 ± 6,1
Актиномицин D + неробол	144 112 ± 3046	428 ± 18,2

Очевидно, при этом повышается эффективность функционирования предсуществующих полирибосом, в результате чего повышается абсолютная скорость синтеза белка. При этом, по всей вероятности, происходит «сопряжённая» стимуляция инициации трансляции и элонгации, поэтому нет существенного изменения полисомного профиля клеток печени при параллельном увеличении абсолютной скорости синтеза белка.

Стимулирующий эффект неробола, судя по опытам с актиномицином D, зависит от синтеза мРНК. В результате возрастает доля транслирующихся полирибосом и изменяется полирибосомный профиль. Соответственно повышается функциональная активность полирибосом в бесклеточной системе синтеза белка. Следует полагать, что действие неробола не исчерпывается

этими изменениями, поскольку нами также отмечена стимуляция активности и на уровне факторов клеточного сока (см. табл. 2).

Следовательно, неробол, вызывая актиномицин D-зависимую стимуляцию синтеза белка, в то же время ускоряет процессы трансляции. В этом случае возможны два варианта. Вновь синтезированные мРНК могут быть более эффективны в системе трансляции или же они не отличаются от предшествующих матриц и неробол стимулирует трансляцию через факторы клеточного сока; не исключено, что в этом принимает основное участие тРНК, так как в наших опытах с антибиотиком в дозе 2 мг/кг ингибировался синтез не только мРНК, но и всех других клеточных РНК, включая транспортные. Регулирующая роль тРНК на уровне трансляции общезвестна [14].

Таким образом, туркестерон и неробол при однократном введении мышам стимулируют синтез белка *in vivo* и *in vitro*: в печени животных увеличивается функциональная активность полирибосом и в связи с этим возрастает скорость синтеза белковых молекул. Усиление синтеза белка под действием туркестерона является следствием активации процессов синтеза белка на уровне трансляции. Стимулирование биосинтеза белка нероболом связано, по-видимому, с синтезом РНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горовиц М. Б., Зацны И. Л., Абубакиров Н. К. — Растительные ресурсы, 1974, № 2, с. 261—274. — 2. Ахрем А. А., Левина И. С., Титов Ю. А. Экдизоны — стероидные гормоны насекомых. Минск, 1973. — 3. Okui S., Otake T., Uchiyama M. et al. — Chem. pharm. Bull., 1968, v. 16, p. 384—387. — 4. Otake T., Okui S., Uchiyama M. — Ibid., 1969, v. 17, p. 75—81. — 5. Сыров В. Н., Курмуков А. Г., Усманов Б. З. — Докл. АН УзССР, 1975, № 2, с. 32—34. — 6. Юдаев Н. А., Покровский Б. В. — Вопр. мед. химии, 1966, № 5, с. 527—532. — 7. Баркова Т. И., Сорокина И. Б. — В кн.: Второй Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы секционных сообщений. Секция 5. Ташкент, 1969, с. 70—71. — 8. Усманов Б. З., Горовиц М. Б., Абубакиров Н. К. — Химия природн. соединений, 1973, № 1, с. 125. — 9. Wettstein F. O., Stachelin T., Noll H. — Nature, 1963, v. 197, p. 430—435. — 10. Olsnes S. — Biochim. biophys. Acta., 1971, v. 232, p. 705—716. — 11. Угарова Т. Ю., Свиткин Ю. В., Гиневская В. А., Агол В. И. — Докл. АН СССР, 1973, т. 211, № 4, с. 996—999. — 12. Абакумова О. Ю., Куценко Н. Г., Ертанов И. Д. и др. — Космическая биол., 1973, № 5, с. 45—51. — 13. Лейтин В. Л., Лерман М. И. — Биохимия, 1975, № 3, с. 513—520. — 14. Остерман Л. А. — Успехи совр. биол., 1971, № 3, с. 353—373.

Поступила 1/IX 1977 г.

#### EFFECT OF TURKESTERONE AND NEROBOLE ON THE ACTIVITY OF PROTEIN SYNTHESIZING SYSTEM IN MICE LIVER

V. N. Syrov, A. G. Kurmukov, A. D. Sakhibov

Laboratory of Pharmacology, Institute of Chemistry of Plant Substances, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Protein biosynthesis was stimulated in liver tissue *in vivo* and *in vitro* after administration into mice of either phytoecdizone of turkesterone (0.5 mg/100 g) or of anabolic steroid compound nerobole (1 mg/100 g). Stimulation of protein biosynthesis was due to an increase in functional activity of polyribosomes and to elevation in the synthesis of protein molecules. Actinomycin D, which inhibited the stimulation of protein biosynthesis in liver tissue of mice treated with nerobole, did not affect the phenomenon in mice treated with turkesterone.

Н. Л. Елаева, Ю. Н. Стройков

**ВЛИЯНИЕ ЭЗЕРИНА НА СИНТЕЗ ДНК В ПЕЧЕНИ КРЫСЫ**

Институт токсикологии Министерства здравоохранения СССР, Ленинград

*Введение эзерина в дозе 0,1—0,2 мг на 100 г вызывает снижение включения радиоактивных предшественников в суммарную и ядерную ДНК печени крыс наряду с увеличением активности ДНК азы- и торможением холинэстеразы печени. При инкубации срезов печени с эзеринем  $2 \cdot 10^{-6}$  М обнаруживается снижение интенсивности синтеза ДНК. Активность ДНК-азы в опытах *in vitro* остается без изменений. Предварительное введение животным холинолитика метацина (0,1 мг на 100 г) не меняет, а в дозе 0,025 мг на 100 г несколько ослабляет эффект эзерина.*

В последние годы обнаружено, что некоторые ингибиторы холинэстеразы изменяют содержание нуклеиновых кислот в тканях животных [1—5]. Однако проведенные исследования были немногочисленны, результаты их часто противоречивы [3, 5], а механизм обнаруженных явлений так и остается неясным. Учитывая широкое практическое применение антихолинэстеразных веществ в качестве инсектицидов и лекарственных препаратов, а также обнаружение у некоторых из них мутагенного, эмбриотоксического, канцерогенного или антибластического свойств [6—11], нельзя исключить возможность влияния этих веществ на генетический аппарат, в частности на синтез ДНК.

Задачей настоящей работы является изучение влияния ингибитора холинэстеразы эзерина на синтез ДНК в печени крыс.

**Методика**

Опыты выполнены на крысах-самцах массы 180—250 г. В опытах *in vivo* эзерин вводили подкожно в дозе 0,01—0,2 мг на 100 г массы. За 1 или 2 ч до декапитации внутрибрюшинно вводили изотопы (Всесоюзное объединение «Изотоп»):  $^{14}\text{C}$ -тимин (удельная радиоактивность 13,9 и 56 мКи/моль),  $^{14}\text{C}$ -тимидин (12,9 мКи/ммоль),  $^3\text{H}$ -тимидин (15, 18,6 и 25 Ки/ммоль) в количестве 5—10 мкКи на 100 г массы. Холинолитик метацин вводили подкожно в дозе 0,1 или 0,025 мг на 100 г за 15 мин до введения эзерина (0,1 мг на 100 г). Печень извлекали, быстро отмывали от крови, осушали фильтровальной бумагой и измельчали, продавливая через отверстия с диаметром 0,9 мм. Измельченную ткань гомогенизировали в десяти объемах холодной дистиллированной воды. К гомогенату добавляли 50% ТХУ до конечной концентрации 5%. Выделение и количественное определение ДНК производили методом Цанева и Маркова [12]. Белок гомогената определяли по Лоури [13]. При изучении синтеза ядерной ДНК ядра выделяли методом Паво [14].

В качестве основного показателя включения метки в ДНК была выбрана относительная удельная радиоактивность, позволяющая учитывать проницаемость клеточных мембран для радиоактивного предшественника и представляющая отношение (в процентах) удельной радиоактивности в импульсах в 1 мин на 1 г к удельной радиоактивности гомогената в импульсах в 1 мин на 1 г белка. Радиоактивность гомогената определяли, внося 0,5 мл гомогената в 10 мл сцинтиллятора следующего состава: 6% нафталина, 0,4% 2,5-дифенилоксазола, 0,02% 1,4-ди-(5-фенил-2-оксазол-бензола), 10% метанола, 2% этиленгликоля, 81,58% диоксана. Для определения радиоактивности ДНК, полученный по методу Цанева и Маркова, кислотный экстракт ДНК в 1 н. хлорной кислоты нейтрализовали насыщенным раствором углекислого калия до pH 7,0, центрифугировали и 0,2 мл надосадочной жидкости вносили в сцинтиллятор вышеуказанного объема и состава. Радиоактивность подсчитывали на счетчике «Трикарб» с эффективностью 60%.

В опытах *in vitro* срезы печени инкубировали в течение 1 ч в сосудах аппарата Варбурга (500 мг в пробе) в растворе Кребса — Рингера при 37°C с постоянной аэрацией кислородом. Предшественником ДНК служил  $^3\text{H}$ -тимидин (5 мкКи на пробу). Опытные пробы содержали эзерин ( $2 \cdot 10^{-6}$  М). Реакцию останавливали, помещая пробы в ледяную баню. Срезы промывали 3—4 раза холодным раствором Кребса — Рингера и гомогенизировали. ДНК выделяли указанным выше методом.

Активность ДНК-азы гомогената определяли после инкубации в течение 1 ч при 37°C с экзогенной ДНК из спермы лосося по приросту оптической плотности при длине волны 260 нм в кислорастворимой фракции [15] на 1 г печени. Пробы содержали 1 мл 0,01 М трис-буфера pH 7,4, 0,4 мл 0,05  $\text{MgSO}_4$ , 0,4 мл 0,1% ДНК и 0,2 мл

5% гомогената печени. При изучении влияния эзерина на активность ДНК-азы *in vitro* гомогенат преинкубировали с эзеринном ( $3 \cdot 10^{-4}$  М) в течение 15 мин.

Активность холинэстеразы определяли методом Хестрина в модификации Панюкова и выражали в микромолях бутирилхолина, гидролизованного 1 г влажной ткани в 1 мин [6].

Результаты опытов обрабатывали статистически по методу Стьюдента, исключая серию опытов по включению  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК срезов печени, применительно к которой использовали критерий Вилкоксона [17].

## Результаты и обсуждение

Введение эзерина животным вызывает глубокое подавление включения предшественников в суммарную ДНК печени (табл. 1, см. рисунок). Необходимость постановки контрольных опытов к каждому изотопному

Таблица 1

Влияние эзерина (0,1 мг на 100 г) на включение радиоактивных предшественников в суммарную и ядерную ДНК печени крыс (относительная удельная радиоактивность)

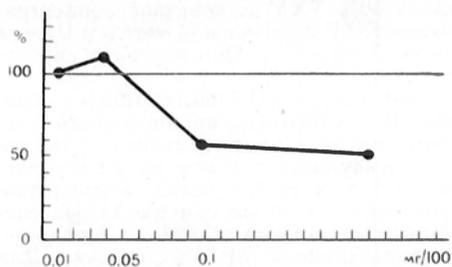
Срок наблюдения, ч	Суммарная ДНК *			Ядерная ДНК **		
	контроль	опыт	P	контроль	опыт	P
1	2098±124 (6)	1685±123 (78%) (6)	<0,05			
2	3880±310 (8)	2720±230 (70%) (7)	<0,05	254±22 (16)	138±15 (70%) (16)	<0,01
4	3880±310 (6)	2116±221 (58%) (6)	<0,06			
24	4815±512 (8)	4825±485 (101%) (8)	>0,05			

\* В качестве радиоактивного предшественника использован  $^{14}\text{C}$ -тимин.

\*\* В качестве радиоактивного предшественника использован  $^3\text{H}$ -тимидин.

Примечание. Здесь и в табл. 2: в скобках — число животных.

эксперименту диктовалась тем, что радиоактивность проб значительно варьировала в зависимости от партии животных и примененных изотопов. Максимальный и ингибирующий эффект отмечался через 4 ч после введения эзерина. Через 1 сут интенсивность включения метки в ДНК у контрольных и подопытных животных не различается.



Влияние различных доз эзерина на включение меченых предшественников в суммарную ДНК печени крыс через 2 ч после его введения.

По оси абсцисс — доза эзерина (в мг на 100 г); по оси ординат — включение (в % к контролю).

Аналогичный эффект торможения включения предшественников в ДНК обнаружен и в ядерной фракции (см. табл. 1) через 4 ч после введения эзерина. Таким образом, эзерин в судорожной, но не летальной дозе вызывает подавление синтеза ядерной ДНК в клетках печени.

В опытах *in vitro* добавление эзерина к срезам печени в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М подавляет включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК на 40% ( $410 \pm 71$  и  $230 \pm 64$ %;  $P < 0,01$ ). Последнее дает основание полагать, что действие эзерина на синтез ДНК в печени локализуется на тканевом уровне. Поскольку в литературе обсуждается вопрос о роли ДНК-азы в ДНК-полимеразной реакции, в изменении содержания ДНК и в ее синтезе [18—21], представляло интерес исследовать активность ДНК-азы печени в наших условиях. Было установлено, что введение эзерина вызывает достоверное повышение активности ДНК-азы на 23% через 2 ч после введения.

В то же время *in vitro* эзерин даже в такой высокой концентрации, как  $3 \cdot 10^{-4}$  М, не изменял активности ДНК-азы гомогената печени. Вероятно, подавление включения предшественников в ДНК, наблюдаемое как *in vivo* с наибольшей выраженностью через 4 ч, так и на срезах, невозможно отнести за счет активации ДНК-азы.

Исследование активности холинэстеразы в печени животных после введения им эзерина показало, что снижение активности холинэстеразы печени предшествует подавлению синтеза ДНК (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Влияние введения эзерина (0,1 мг на 100 г) на активность холинэстеразы печени крысы (в мкмоль на 1 г в 1 мин)

Срок наблюдения	Контроль	Опыт	P
15 мин	0,75±0,03 (12)	0,28±0,03 (37%) (12)	<0,01
30 мин	0,75±0,02 (11)	0,28±0,03 (37%) (12)	<0,01
60 мин	0,67±0,03 (12)	0,38±0,03 (57%) (12)	<0,01
120 мин	0,57±0,02 (12)	0,38±0,02 (67%) (14)	<0,05
240 мин	0,65±0,03 (12)	0,57±0,02 (88%) (14)	>0,05
24 ч	0,70±0,03 (12)	0,75±0,03 (105%) (12)	>0,05

Если влияние эзерина на синтез ДНК в печени связано с увеличением концентрации ацетилхолина, воздействующего на холинорецепторы печени, то защита холинорецепторов путем предварительного введения холинолитика должна нивелировать эффект эзерина. Однако при предварительном введении метацина в дозе 0,1 мг на 100 г суммарный эффект скорее отражает действие эзерина, нежели периферического холинолитика (табл. 3). При использовании меньшей дозы метацина (0,025 мг на 100 г) подавление синтеза ДНК оказывается значительно менее выраженным, чем при действии одного эзерина.

Т а б л и ц а 3

Совместное действие метацина и эзерина на включение  $^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК печени крысы (относительная удельная радиоактивность)

Доза метацина, мг на 100 г	Контроль	Метацин	Метацин и через 15 мин эзерин (0,1 мг на 100 г)
0,1	1740±155	1120±142 (65%); $P < 0,05$	772±64 (49%); $P < 0,01$
0,025	1200±103	1940±105 (160%); $P < 0,05$	1075±99 (89%); $P < 0,05$

П р и м е ч а н и е. Животных забивали через 2 ч после введения холинолитика метацина. В каждой группе 8 животных.

Поскольку предварительное введение холинолитика не снимает эффект эзерина на синтез ДНК, можно предполагать, что это действие есть отражение его непосредственного влияния на изученную систему и проявляется, несмотря на блокаду холинорецептора метацином, взятым в заведомо блокирующей дозе.

Возможно также предположение, что изменение синтеза ДНК может быть следствием изменения состояния клеточной мембраны, что наблюдается при действии ряда инсектицидов и эзерина [22]. Нельзя также исключить возможность прямого воздействия эзерина на процессы синтеза ДНК.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Соколовский В. В. — Цитология, 1959, № 1, с. 431. — 2. Торопова Г. П., Егорова Е. В. — Вопр. питания, 1967, № 2, с. 16. — 3. Меркулов М. Ф., Лескова С. Г. — Фармакол. и токсикол., 1971, № 2, с. 220. —

4. Кириченко Л. Г. — Науч. докл. высш. школы. Биол. науки, 1971, № 12, с. 31. — 5. Тимошевский В. Н. — Там же, 1968, с. 62, № 5. — 6. Nagris P. N., Gibson W. R., Dillard R. D. — Toxicol. appl. Pharmacol., 1972, v. 21, p. 414. — 7. Раппопорт И. А., Костяновский Р. Г. — Докл. АН СССР, 1960, т. 131, с. 191. — 8. Раппопорт И. А. — Бюлл. Моск. о-ва испытателей природы. отд. биол., 1963, вып. 149, с. 68. — 9. Чернов В. А., Лыткина В. Б., Сергиевская С. И. и др. — Фармакол. и токсикол., 1959, № 4, с. 365. — 10. Epstein S. S. — Science, 1970, v. 168, p. 584. — 11. Воронина В. М. — В кн.: Гигиена применения, токсикология пестицидов и клиника отравлений. Киев, 1971, вып. 9, с. 254. — 12. Цанев Р. Г., Марков Г. Г. — Биохимия, 1960, т. 25, с. 151. — 13. Lowry O. U., Rosebrough N., Farr A. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265. — 14. Chaveau J. M., Roiller Ch. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, v. 39, p. 1521. — 15. Рысина Г. И., Либинзон Р. Е., Шарова Э. Г. — Биохимия, 1971, т. 36, с. 532. — 16. Панюков А. Н. — Вопр. мед. химии, 1966, № 1, с. 88. — 17. Снедекор Д. У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. М., 1961. — 18. Mazia D., Hinegardner K. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1963, v. 50, p. 148. — 19. Боллум Ф. — В кн.: Нуклеиновые кислоты. М., 1965, с. 9. — 20. Ковтуняк Н. А., Бордяковская Л. Г. — Фармакол. и токсикол., 1972, № 1, с. 44. — 21. Винтер В. Г., Беляева М. И., Зоткина Н. Л. — Биохимия, 1974, т. 39, с. 923. — 22. Flockhart J. R., Casida J. E. — Biochem. Pharmacol., 1972, v. 21, p. 2591.

Поступила 1/XI 1977 г.

## EFFECT OF ESERINE ON DNA SYNTHESIS IN RAT LIVER TISSUE

N. L. Elaeva, Yu. N. Strojko

Institute of Toxicology, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

Incorporation of labelled precursors into total and nuclear DNA of liver tissue was inhibited after administration into animals of eserine at a dose 0.1—0.2 mg/100 g of body weight. Simultaneously, DNAase activity was increased and cholinesterase activity was inhibited in liver tissue. The DNA synthesis was inhibited in liver slices, if they were incubated with  $2 \cdot 10^{-6}$  M eserine. The DNAase activity was unaltered in vitro. A cholinolytic compound metacin, pre-administered into the animals, was ineffective at dose of 1 mg/kg; it slightly decreased the effect of eserine at dose of 0.25 mg/kg.

УДК 612.419.015.1.014.46:615.357.453

Д. И. Бельченко, В. Ю. Доманский, Н. Я. Ханина

## ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР И АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ЭРИТРОИДНЫХ И МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКА И ОСОБЕННОСТИ ИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИДРОКОРТИЗОНА

Кафедра патологической физиологии Калининского медицинского института

Миелоидные миелокариоциты кролика обладают более высокой активностью гексокиназы (ГК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) по сравнению с клетками эритроидного ряда. Их липолитическая активность более чем в 2 раза выше, чем в эритроидных миелокариоцитах. По активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) оба вида костномозговых клеток не отличаются друг от друга. Наибольшие различия изоферментного спектра были найдены для Г-6-ФДГ, в изоферментных спектрах ГК и ЛДГ в эритроидных и миелоидных миелокариоцитах не обнаружено существенных различий. Характер изменений ферментативной активности после введения гидрокортизона различен для эритроидных и миелоидных клеток. В миелоидных клетках активность ГК понижалась, в эритроидных активность ГК обнаруживала четкую тенденцию к повышению, липолитическая активность понижалась. Изменения изоферментного спектра Г-6-ФДГ и ЛДГ, вызванные введением гидрокортизона, и в миелоидных, и в эритроидных миелокариоцитах имели одинаковую направленность.

В предыдущих исследованиях были установлены определенные особенности некоторых показателей углеводного обмена, характерные для эритроидных или миелоидных миелокариоцитов [1], и показано специфическое влияние на них гидрокортизона, зависящее от вида костномозговых клеток [2]. Настоящая работа посвящена сравнительному исследованию изоферментных спектров и активности некоторых ферментов в эритроидных и

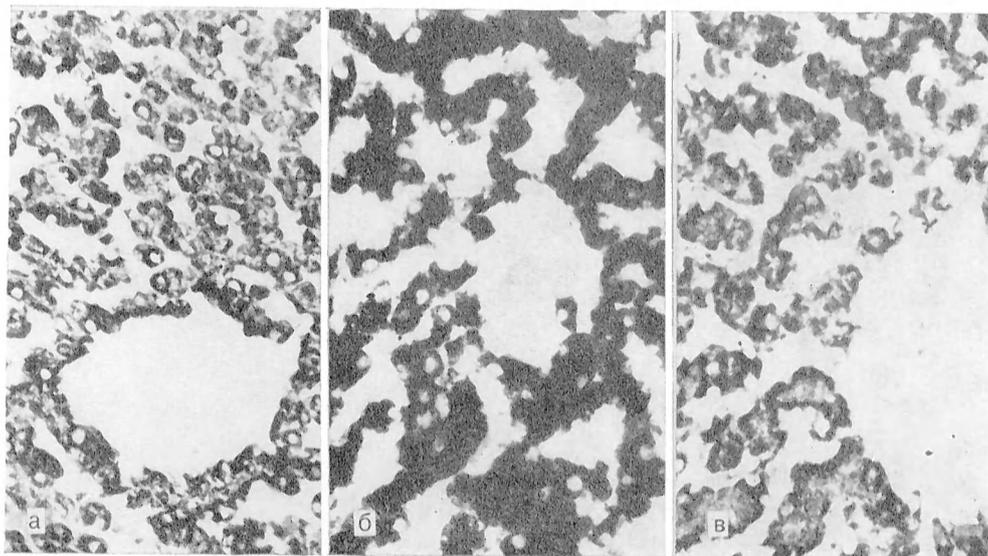


Рис. 1. Изменения активности Г-6-Ф-азы в разные сроки после денервации печени. *а* — контроль; *б* — через 2 нед после операции; *в* — через 3 мес после операции. Метод Чикунна. Микрофотография. Ув. 250.

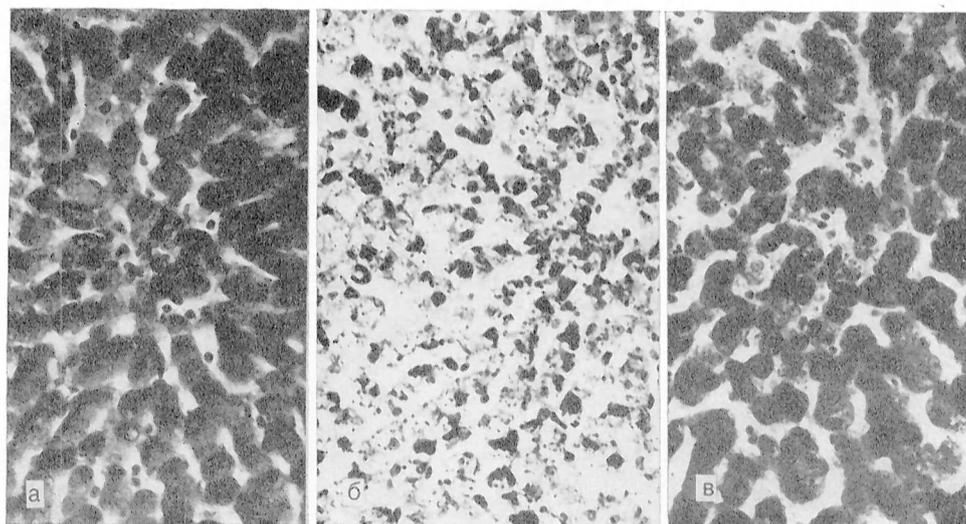


Рис. 2. Изменение содержания и характера локализации гликогена после денервации печени. *а* — контроль; *б* — 2 нед после операции; *в* — 3 мес после операции. Метод Беста. Микрофотография. Ув. 250.

К ст. Чибисова И. В. и др.

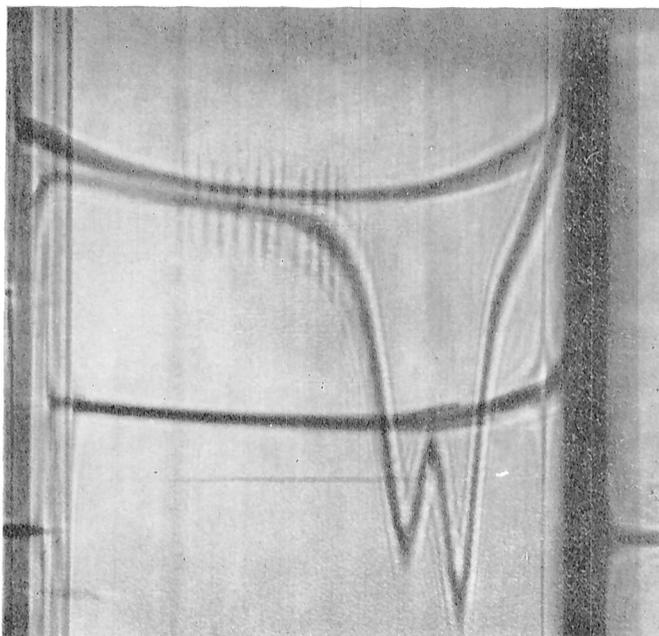


Рис. 1. Верхняя кривая — флотационная диаграмма липопротеидов большой М. от 25/1 1977 г. Плотность растворителя 1,063 г/мл. Скорость вращения ротора 52 640 об/мин, снимок сделан через 30 мин после достижения скорости. Угол наклона фазовой пластинки 60.

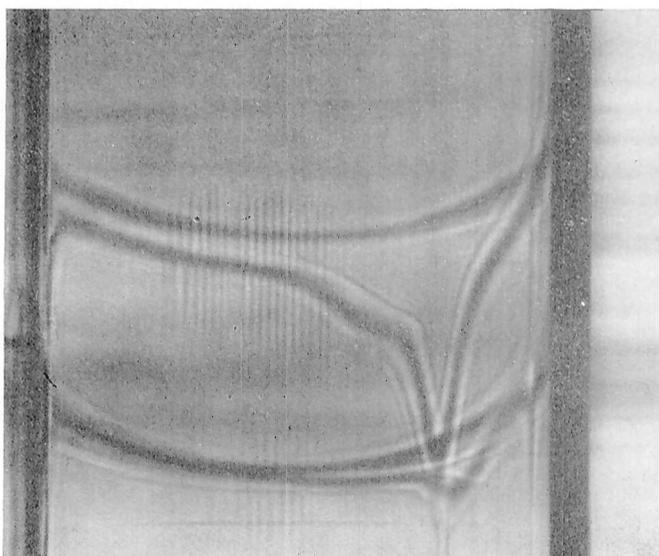


Рис. 2. Верхняя кривая — флотационная диаграмма липопротеидов большой М. от 18/IV 1977 г. Условия ультрацентрифугирования те же, что на рис. 1.

миелоидных клетках и характеру их изменений после введения гидрокортизона.

Опыты поставлены на кроликах породы шиншилла массой 2,5—3 кг. У животных 1-й группы повторными кровопусканиями вызывали развитие эритроидной гиперплазии костного мозга, у кроликов 2-й группы повторными инфузиями отмытых изогенных эритроцитов вызывали редукцию костномозгового эритропоэза. При пункции бедренных и большеберцовых костей получали костный мозг, содержащий в основном эритроидные (1-я группа) или миелоидные клетки (2-я группа животных). Миелокарициты выделяли из пунктата костного мозга гемолитическим методом [3]. Методические подробности воспроизведения эритроидной гиперплазии костного мозга или редукции в нем эритропоэза, а также способа выделения миелокарицитов изложены в предыдущем сообщении [4]. После выделения миелокарицитов подсчитывали миелограмму в мазках из их взвеси. После суспендирования в 0,15 М КСl миелокарициты разрушали пятикратным замораживанием и оттаиванием с последующей го-

Активность ГК, Г-6-ФДГ, ЛДГ (в мкмоль на 1 г белка в минуту) и липолитическая активность (в мкг свободных жирных кислот на 1 мг белка в час) эритроидных и миелоидных миелокарицитов и влияние на нее гидрокортизона ( $M \pm m$ )

Фермент	Миелоидные клетки		Эритроидные клетки	
	исходное состояние	после введения гидрокортизона	исходное состояние	после введения гидрокортизона
ГК	14 ± 1,2 (18)	6,7 ± 1,1 (18) $P = 0,001$	9 ± 0,9 (34) $P_1 = 0,002$	12 ± 1,1 (17) $P = 0,05$
Г-6-ФДГ	76 ± 8,4 (14)	105 ± 8,9 (14) $P = 0,02$	70 ± 6,2 (21)	111 ± 16,1 (21) $P = 0,04$
ЛДГ	84 ± 14,9 (12)	87 ± 11,7 (12)	45 ± 10,2 (15) $P_1 = 0,04$	48 (15)
Липолитическая активность	230 ± 44,0 (14) $P_1 = 0,003$	160 ± 20 (19) $P = 0,17$	80 ± 10,0 (17)	26 ± 7,1 (14) $P < 0,001$

Примечание.  $P$  — показатель достоверности различия с исходными данными,  $P_1$  — показатель достоверности различия между миелоидными и эритроидными клетками. В скобках — число животных.

могенизацией на льду в течение 7—8 мин. Гомогенат центрифугировали при 7000 г и температуре 0—2°C в течение 20 мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве источника ферментов. После получения пунктата костного мозга животным вводили гидрокортизон (40—50 мг на 1 кг массы внутримышечно) [5—7] и через 18—20 ч с помощью повторной костномозговой пункции получали миелокарициты для исследования. Продолжительность этого срока была обусловлена применением микрокристаллического препарата гидрокортизона, обладающего замедленной резорбтивностью. Активность гексокиназы (ГК), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра СФ-16. Состав инкубационной смеси при определении активности ГК: 0,05 мМ трис-НСl-буфер рН 7,4, 0,2 мМ НАДФ, 10 мМ АТФ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 ед. Г-6-ФДГ, 100 мМ глюкозы, экстракт из миелокарицитов с содержанием белка 50—100 мкг — 0,1 мл; общий объем 3 мл. Состав инкубационной смеси при определении активности Г-6-ФДГ: 0,25 мМ глицил-глициновый буфер, рН 7,6, глюкозо-6-фосфат — 3 мМ, MgCl<sub>2</sub> — 7 мМ, НАДФ — 0,33 мМ, экстракт из миелокарицитов — 0,1 мл; общий объем 3 мл. Инкубационная смесь при измерении активности ЛДГ: пируват натрия — 0,01 мМ, НАД.Н — 0,2 мМ, калий-фосфатный буфер рН 7,4—0,033 М; общий объем 3 мл. Липолитическую активность определяли описанным методом [8].

Спектр изоферментов ГК, Г-6-ФДГ и ЛДГ исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле в описании Мауера [9], реактивы для его проведения использовали из наборов «Реанал» (Венгрия). Для разделения изоферментов ГК использовали 6%, Г-6-ФДГ — 7% и ЛДГ — 5,5% гель. Была разработана камера оригинальной конструкции, позволявшая проводить электрофорез на плоских прямоуголь-

ных гелевых столбиках, удобных для денситометрии. Условия электрофореза: при разделении изоферментов ГК и Г-6-ФДГ первые 30 мин 2 мА на столбик геля сечением  $0,3 \text{ см}^2$ , затем — 5 мА на столбик в течение  $1\frac{1}{2}$ —2 ч; при разделении изоферментов ЛДГ — 4,5 мА на столбик в течение 2 ч. Электрофорез проводили при температуре тающего льда. Изоферменты ГК выявляли в инкубационной смеси следующего состава: глюкоза — 100 мМ, АТФ — 2 мМ,  $\text{MgCl}_2$  — 5 мМ, НАДФ — 5 мМ, нитросиний тетразолий — 400 мкг/мл, феназинметасульфат — 40 мкг/мл,  $\text{KCN}$  — 2 мМ, 50 мМ трис-буфер рН 7,5. При выявлении изоферментов Г-6-ФДГ использовали инкубационную смесь следующего состава: глюкозо-6-фосфат натрия — 15 мМ, НАДФ — 0,3 мМ, сульфат магния — 5,8 мМ, нитросиний тетразолий — 200 мкг/мл, феназинметасульфат — 20 мкг/мл, 50 мМ трис-буфер рН 7,6. Смесь для выявления изоферментов ЛДГ: лактат натрия — 1 г, НАД — 30 мг, нитросиний тетразолий — 40 мг, феназинметасульфат — 7 мг, трис-буфер рН 8,3 — до 100 мл. На столбик геля наносили 0,2 мл экстракта с содержанием белка 250—300 мкг. Количество белка в экстрактах определяли по Лоури [10].

## Результаты

Данные об активности исследованных ферментов представлены в таблице. Активность ГК и ЛДГ в миелокариоцитах, представленных на  $60 \pm \pm 4,4\%$  эритроидными клетками, была существенно ниже активности этих ферментов в клетках, представленных преимущественно ( $92 \pm 3,9\%$ ) элементами миелоидного ряда.

Липолитическая активность в эритроидных клетках также была значительно ниже, чем в миелоидных миелокариоцитах. Активность Г-6-ФДГ была одинаковой в эритроидных и миелоидных костномозговых клетках. В этом отношении результаты наших исследований несколько отличаются от данных Д. С. Симкина [11].

При исследовании изоферментного спектра ГК не было обнаружено различий для эритроидных и миелоидных клеток. На электрофореграммах экстрактов из миелокариоцитов обоих видов были выявлены три, реже две фракции ГК, располагающиеся в зоне медленных печеночных гексокиназ (рис. 1). При электрофорезе экстрактов из костномозговых клеток миелоидного ряда были обнаружены две медленные фракции Г-6-ФДГ с низкой активностью и две быстрые со значительно более высокой активностью (рис. 2). Что касается миелокариоцитов, представленных преимущественно клетками эритроидного ряда, то в 80% исследований активность быстрых фракций — особенно первой фракции — была более высокой, а активность одной из медленных — третьей — более низкой по сравнению с соответствующими фракциями миелоидных клеток (см. рис. 2). И в эритроидных, и в миелоидных миелокариоцитах постоянно выявляли фракции ЛДГ, — ЛДГ<sub>4</sub> (рис. 3). Фракция ЛДГ<sub>5</sub> выявлялась редко, однако в экстрактах из миелоидных клеток чаще, чем в экстрактах из эритроидных (соответственно в 33 и 8% исследований). Соотношение активностей фракций было также примерно одинаковым:

$\text{ЛДГ}_1 < \text{ЛДГ}_2 = \text{ЛДГ}_3 > \text{ЛДГ}_4$ , хотя в миелоидных клетках чаще, чем в эритроидных, наблюдалась высокая активность ЛДГ<sub>4</sub>.

Таким образом, в результате исследования активности ГК, Г-6-ФДГ и ЛДГ и их изоферментного спектра в эритроидных и миелоидных костномозговых клетках были обнаружены главным образом количественные различия суммарной активности исследованных ферментов. Качественные раз-

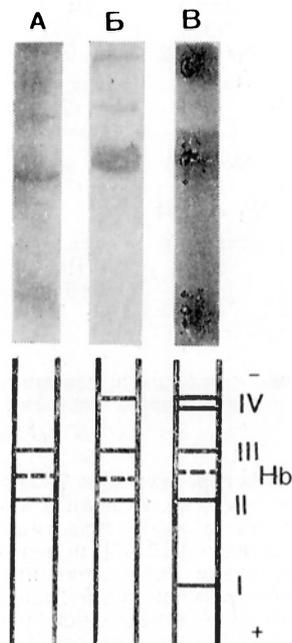


Рис. 1. Изоферменты ГК костного мозга и печени кролика.

А и Б — изоферменты ГК эритроидных и миелоидных миелокариоцитов; В — изоферменты ГК печени.

личия, касающиеся характеристики изоферментного спектра, были невелики и относились в основном к особенностям изоферментного состава Г-6-ФДГ в эритроидных и миелоидных миелокариоцитах. Общность изоферментного спектра эритроидных и миелоидных миелокариоцитов можно рассматривать, по-видимому, как следствие происхождения этих клеток от общего предшественника. Количественные различия активности некоторых

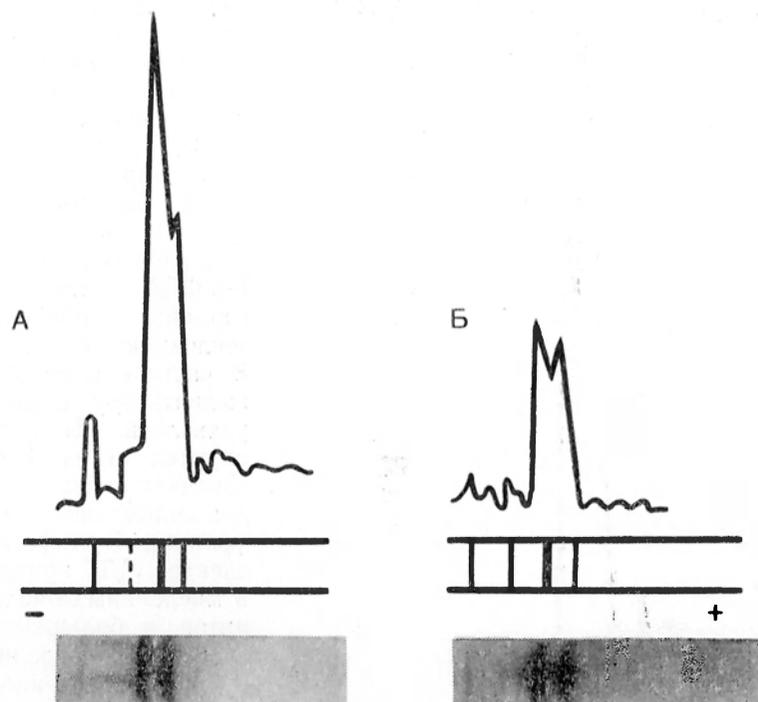


Рис. 2. Изоферменты Г-6-ФДГ эритроидных (А) и миелоидных (Б) миелокариоцитов и их денситограмма.

изоферментов и различия суммарной ферментативной активности, видимо, являются следствием специфической дифференцировки эритроидных и миелоидных элементов.

Различия ферментных систем эритроидных и миелоидных костномозговых клеток проявляются также неодинаковым характером их реакции на введение гидрокортизона. Активность ЛДГ в миелоидных и эритроидных миелокариоцитах не претерпевала каких-либо изменений после введения гормона. Лиолитическая активность резко снижалась в эритроидных, а активность Г-6-ФДГ существенно повышалась и в эритроидных, и в миелоидных клетках. Введение гидрокортизона вызывало снижение гексокиназной активности в миелоидных миелокарио-

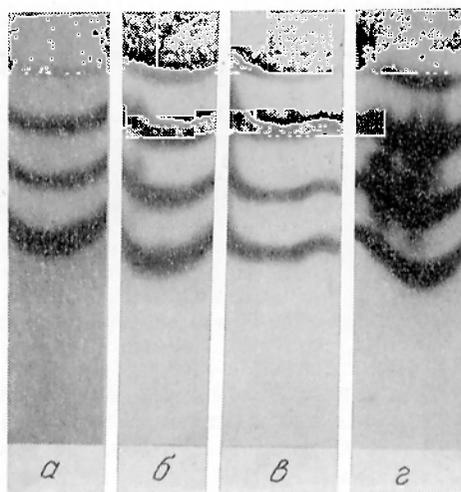


Рис. 3. Изоферменты ЛДГ клеток костного мозга кроликов.

А — эритроидные миелокариоциты; Б — эритроидные миелокариоциты после введения гидрокортизона; В — миелоидные миелокариоциты; Г — миелоидные миелокариоциты после введения гидрокортизона.

цитах, в то время как в эритроидных клетках обнаруживалась тенденция к ее повышению (см. таблицу). Таким образом, изменения гексокиназной и липолитической активности в эритроидных и миелоидных клетках были различными. Изменения суммарной активности Г-6-ФДГ после введения гормона обнаружили одинаковую направленность в эритроидных и миелоидных миелокариоцитах. Исследования изоферментного спектра подтверждают это заключение. Так, после введения гидрокортизона в обоих ви-

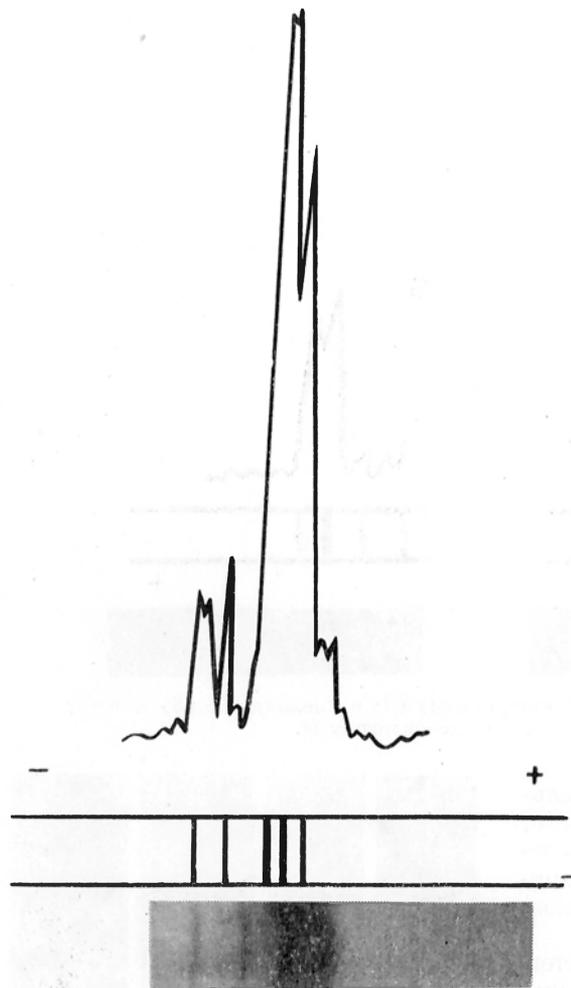


Рис. 4. Изоферменты Г-6-ФДГ эритроидных миелокариоцитов после введения гидрокортизона и их денситограмма.  
Видна дополнительная быстрая фракция.

удах костномозговых клеток наблюдалось заметное повышение активности обеих быстрых фракций Г-6-ФДГ, причем наибольший прирост был присущ самой быстрой фракции (рис. 4). Активность самой медленной фракции Г-6-ФДГ после введения гормона обнаруживала тенденцию к снижению. В части опытов (3 из 14) выявить эту фракцию не удавалось. В отдельных случаях (3 из 14 опытов) отмечали появление одной дополнительной быстрой фракции. В изоферментном спектре ЛДГ эритроидных и миелоидных миелокариоцитов в большинстве исследований после введения гидрокортизона наблюдали повышение интенсивности ЛДГ<sub>4</sub> (см. рис. 3).

Результаты наших исследований согласуются с данными В. С. Ильина и его сотрудников, установивших торможение тканевых гексокиназ после введения гидрокортизона [5, 7, 12]. Изменений активности ЛДГ в миелокариоцитах мы не наблюдали, было отмечено лишь увеличение содержания ЛДГ<sub>4</sub>. По данным Л. И. Цанко и М. С. Усатенко [13], торможение ЛДГ и

уменьшение ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub> выявлялись лишь в красной мышце кролика, тогда как в смешанной мышце и печени активность и изоферментный состав ЛДГ после введения гормона не изменялись, что не противоречит нашим результатам. Полученные нами данные об активации Г-6-ФДГ в эритроидных и миелоидных миелокариоцитах в известной мере подтверждаются резкой активацией пентозного цикла в клетках лимфомы мышей после введения гидрокортизона [6].

Проведенное нами исследование изоферментного спектра Г-6-ФДГ и ЛДГ свидетельствует о том, что механизм влияния гидрокортизона на метаболизм костномозговых клеток проявляется в индуцировании биосинте-

за определенных изоферментов. Индуцирующее влияние гормона на быстрые фракции Г-6-ФДГ и ЛДГ<sub>4</sub> распространялось и на эритроидные, и на миелоидные клетки костного мозга. Это позволяет заключить, что представление об индуцировании синтеза ферментов гидрокортизоном [14, 15] распространяется и на клетки костного мозга.

После введения гормона уменьшалось содержание зрелых форм гранулоцитов в костном мозге. Трудно сказать, в какой степени это явление связано с изменениями активности и изоферментного спектра исследованных ферментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бельченко Д. И., Зиновьев Ю. В., Симкина Г. В. и др. — Бюлл. exper. биол., 1971, № 8, с. 52—54. — 2. Бельченко Д. И., Зиновьев Ю. В., Симкин Д. С. — Там же, 1972, № 5, с. 17—20. — 3. Nagt1 W. — Acta haemat. (Basel), 1962, v. 28, p. 273—282. — 4. Доманский В. Ю., Бельченко Д. И. — Вопр. мед. химии, 1975, № 5, с. 489—492. — 5. Шаныгина К. И. — Биохимия, 1971, № 2, с. 363—367. — 6. Казьмин С. Д., Баглей Е. А. — Вопр. мед. химии, 1976, № 1, с. 26—30. — 7. Плесков В. М. — Биохимия, 1973, № 2, с. 283—286. — 8. Ястребов А. П., Яценко Е. А., Сырнев В. А. — Бюлл. exper. биол., 1973, № 7, с. 45—47. — 9. Маурер Г. Диск — электрофорез. М., 1971. — 10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275. — 11. Симкин Д. С. — Вопр. мед. химии, 1975, № 4, с. 343—346. — 12. Ильин В. С., Шаныгина К. И. — Там же, 1960, № 3, с. 291—300. — 13. Цапко Л. И., Усатенко М. С. — Биохимия, 1973, № 1, с. 156—159. — 14. Кпох W. E. — Brit. J. exp. Path., 1951, v. 32, p. 462—467. — 15. Протасова Т. Н. В кн.: Современные вопросы эндокринологии. М., 1969, вып. 3, с. 110—117.

Поступила 1/IX 1977 г.

#### ISOENZYME SPECTRA AND ACTIVITIES OF SEVERAL ENZYMES FROM ERYTHROID AND MYELOID CELLS OF RABBIT BONE MARROW AND PATTERNS OF THEIR ALTERATIONS UNDER THE EFFECT OF HYDROCORTISONE

*D. I. Bel'chenko, V. Yu. Domansky, N. Ya. Khanina*

Chair of Pathophysiology, Medical School, Kalinin

Rabbit myeloid myelocaryocytes possessed higher activities of hexokinase (HK) and lactate dehydrogenase (LDH) as compared with those of erythroid cells. The lipolytic activity was twice as high in myeloid myelocaryocytes as in erythroid ones. Both strains of medullary cells did not differ in the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). But the isoenzyme spectra of G6PD varied distinctly in these cells; HK and LDH isoenzyme spectra were the same both in myeloid and erythroid cells. The enzymatic activity was altered similarly in myeloid and erythroid cells after administration of hydrocortisone. In myeloid cells the HK activity was decreased, in the erythroid cells — the HK activity tended to increase and the lipolytic activity was decreased. Alterations in the isoenzyme spectra of G6PD and LDH, caused by hydrocortisone administration, exhibited similar patterns in myeloid and erythroid cells.

УДК 616.833-002-031.14 + 616.832-002]-07:[616.154.8 + 616.36]-07

*B. B. Михайлов, Н. Н. Отдельнова*

#### БИОГЕННЫЕ АМИНЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ И ПОСТДИФТЕРИЙНОМ ПОЛИНЕВРИТЕ У СОБАК

Московский медицинский стоматологический институт им. Н. А. Семашко, Саратовский медицинский институт

У собак с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом (ЭАЭ) выявлено увеличение содержания гистамина и серотонина в крови бедренной артерии и печеночной вены, снижение активности гистаминазы в ткани печени. На фоне дыхательной недостаточности, сопровождающей паралитический синдром, в крови и ткани печени возрастало количество молочной кислоты (МК) и снижалось содержание гликогена в печеночной паренхиме. Бром-

*сульфалеиновым методом установлено снижение концентрационной и очистительной функций печени у животных с развившимся ЭАЭ. При постдифтерийных полиневритах (ПДП) содержание МК в печеночной ткани и ее сосудистом русле не изменялось. Нарушение желчевыделительной, концентрационной, очистительной функций печени и изменение уровня биогенных аминов были выражены в меньшей степени, чем при ЭАЭ.*

Повреждение соматической и вегетативной нервной системы при постдифтерийных полиневритах (ПДП) и экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ) сочетается с изменением содержания биологически активных веществ и гормонов в общем кровотоке и тканях [1—4]. Наряду с этим многие авторы отмечают патологические изменения метаболической, экскреторной и других функций печени [5—7]. Основываясь на данных о регулирующем влиянии печени на концентрацию биологически активных веществ и гормонов в крови [8—10], можно предположить, что при демиелинизирующих процессах происходит нарушение их инактивации в этом органе.

В связи с этим представляло интерес выяснить, изменяется ли при ПДП и ЭАЭ концентрация биогенных аминов в крови и печени и сочетается ли это с нарушением ее желчевыделительной и очистительной способности.

### М е т о д и к а

Опыты ставили на беспородных собаках обоего пола массой от 8 до 20 кг. ПДП воспроизводили по методу Фрика [11] путем внутримышечного введения инактивированного дифтерийного токсина из расчета 0,16 ДЛМ на 1 кг массы (1 ДЛМ для морской свинки составила 0,003 мл). При указанной дозировке первоначальные признаки ПДП — неустойчивость походки, парез и атрофия мышц, преимущественно задних конечностей, — отмечались через 20—28 дней после введения токсина. Клинические симптомы ПДП наблюдались около 2 нед, после чего животные, как правило, выздоравливали.

ЭАЭ возникал у собак после введения в подушечки лап и под кожу спины энцефалитогенной смеси (гомогената гомологичного спинного мозга с полным стимулятором Фрейнда в соотношении 1 : 1) в количестве 6—9 мл. Через 9—10 дней с момента иммунизации появлялись парезы вначале задних конечностей, позднее они переходили в пара- и тетраплегию. На этом фоне развивалась дыхательная недостаточность и животные на 11—12-й день погибали.

Животных наркотизировали этиминалом натрия (25 мг/кг внутривенно), отпрепаровывали артерию и вены печени для взятия проб крови, одновременно иссекали участок ткани печени. Гистамин определяли по методу Конна и Шора [12], гистаминазу — по Шору и соавт. [13], серотонин — по Шнайдеру и Аксельроду [14], 5-ОИУК — по Юденфреду [15]. Гистамин и серотонин в крови и тканях определяли на спектрофлуориметре (спектр возбуждения 365 нм, фильтр УФС-1). Спектр флуоресценции выделяли монохроматором, ее интенсивность измеряли с помощью фотоумножителя ФЭУ-59, соединенного с усилителем постоянного тока. В ряде опытов у наркотизированных животных печень замораживали жидким азотом, извлекали участки ткани и в них определяли молочную кислоту (МК) по Баркеру и Саммерсону [16], пировиноградную кислоту по Фридеману и Хаугену [17], гликоген по Зейфтеру и соавт. [18]. Очистительную функцию печени исследовали бромсульфалеиновым методом [19] у ненаркотизированных животных, которым за 5—7 дней до постановки контрольного опыта накладывали фистулу желчного пузыря. Пробы печеночной желчи, крови и мочи брали во время эксперимента через каждые 30 мин в течение 1½ ч при постоянной концентрации красителя в крови, что достигалось капельной инфузией 5% раствора препарата в одну из вен голени. Результаты этой серии опытов выражали в процентах к контролю, статистически результаты обрабатывали разностным методом.

### 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 мы решили уточнить, сохраняет ли печень способность инактивировать биогенные амины при тяжелом прогрессирующем течении энцефаломиелита. Как видно из табл. 1 и 2, в артериальной крови значительно увеличивается содержание гистамина и намного меньше — серотонина. Несмотря на нормальную концентрацию гистамина и снижение содержания серотонина в крови, притекающей к печени по воротной вене, в крови печеночной вены уровень гистамина повышен, а концентрация серотонина приближалась к таковой в контроле. В ткани печени, наоборот,

Т а б л и ц а 1

Содержание гистамина в печени (в мкг/г) и крови (в мкг/мл), активность гистаминазы (в ед.) печени у собак при ЭАЭ и ПДП

Группа животных	Число опытов	Гистамин				Число опытов	Активность гистаминазы
		a. femoralis	v. hepatica	v. porta	печень		
Контрольная	18	0,04±0,006	0,02±0,004	0,06±0,006	2,64±0,3	10	123±6,9
Заболевшие ЭАЭ	10	0,20±0,03 <i>P</i> < 0,001	0,04±0,007 <i>P</i> < 0,01	0,06±0,001 <i>P</i> > 0,05	2,65±0,4 <i>P</i> > 0,05	10	98,1±4,0 <i>P</i> < 0,01
Не заболевшие ЭАЭ	8	0,04±0,009 <i>P</i> > 0,05 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,001	0,03±0,009 <i>P</i> > 0,2 <i>P</i> <sub>1</sub> > 0,05	0,03±0,003 <i>P</i> < 0,001 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,001	5,7±0,8 <i>P</i> < 0,01 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,01	10	166±15,1 <i>P</i> < 0,02 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,01
Животные с ПДП	10	0,02±0,002 <i>P</i> > 0,05 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0,001	0,014±0,001 <i>P</i> > 0,05 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,05 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0,05	0,015±0,001 <i>P</i> < 0,001 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,05 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0,05	3,65±0,04 <i>P</i> < 0,01 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,05 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0,05	10	139±10,0 <i>P</i> > 0,1 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,01 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0,01

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: *P* — по отношению к контролю; *P*<sub>1</sub> — по отношению к группе собак с ЭАЭ; *P*<sub>2</sub> — по отношению к группе собак, не заболевших ЭАЭ.

Т а б л и ц а 2

Содержание серотонина в печени (мкг/г) и крови (мкг/мл), экскреция 5-ОИУК (мкг/мл) с мочой при ЭАЭ и ПДП у собак

Группа животных	Число опытов	Серотонин				Число опытов	5-ОИУК
		a. femoralis	v. hepatica	v. porta	печень		
Контрольная	17	0,20±0,02	0,15±0,01	0,30±0,02	2,9±0,2	20	6,0±0,3
Заболевшие ЭАЭ	10	0,29±0,03 <i>P</i> < 0,05	0,15±0,01 <i>P</i> > 0,1	0,12±0,02 <i>P</i> < 0,02	7,3±0,8 <i>P</i> < 0,001	10	11,7±0,4 <i>P</i> < 0,001
Не заболевшие ЭАЭ собаки	8	0,14±0,02 <i>P</i> < 0,05 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,001	0,09±0,03 <i>P</i> < 0,05 <i>P</i> <sub>1</sub> > 0,05	0,13±0,03 <i>P</i> < 0,02 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,05	5,2±0,4 <i>P</i> < 0,001 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,05	8	12,2±1,6 <i>P</i> < 0,001 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,001
Животные с ПДП	10	0,08±0,01 <i>P</i> < 0,001 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0,001	0,08±0,01 <i>P</i> < 0,001 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,001 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0,05	0,09±0,01 <i>P</i> < 0,001 <i>P</i> <sub>1</sub> > 0,05 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0,05	6,2±0,8 <i>P</i> < 0,001 <i>P</i> <sub>1</sub> > 0,05 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0,05	10	8,4±0,3 <i>P</i> < 0,05 <i>P</i> <sub>1</sub> < 0,001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0,05

было повышено содержание серотонина. Активность гистаминазы заметно снижалась. Одновременно мы наблюдали увеличение экскреции 5-ОИУК с мочой. Таким образом, на фоне тяжелого энцефаломиелита ткань печени не теряет способности инактивировать серотонин, в то время как инактивация гистамина существенно нарушается и его количество в крови, оттекающей от печени, возрастает.

Т а б л и ц а 3

Содержание гликогена, МК, ПК в крови и печени собак при ЭАЭ и ПДП

Исследуемый показатель	Место забора проб	Контроль	Животные с ПДП	Животные заболевшие ЭАЭ	Животные не заболевшие ЭАЭ
МК, мг/100 мл	Бедренная артерия	8,8±0,6	9,59±0,5 $P > 0,05$	26,0±2,9 $P < 0,001$	19,7±2,0 $P < 0,001$
	Печеночная вена	10,3±0,7	10,7±1,0 $P > 0,05$	26,7±3,2 $P < 0,001$	14,2±1,1 $P < 0,01$
	Воротная вена	10,7±0,9	11,3±1,4 $P > 0,05$	26,7±2,2 $P < 0,001$	14,3±1,1 $P < 0,01$
	Печень	10,7±0,8	9,6±0,6 $P > 0,05$	21,4±2,3 $P < 0,001$	14,8±1,3 $P < 0,02$
ПК, мг/100 мл	Бедренная артерия	1,9±0,1	2,1±0,1 $P > 0,05$	2,2±0,3 $P > 0,05$	1,5±0,1 $P < 0,05$
	Печеночная вена	2,0±0,3	2,0±0,1 $P > 0,05$	2,0±0,2 $P > 0,05$	1,2±0,1 $P < 0,05$
	Воротная вена	1,9±0,08	2,1±0,08 $P > 0,02$	1,7±0,2 $P > 0,05$	1,2±0,08 $P < 0,001$
	Печень	1,6±0,08	1,4±0,07 $P < 0,05$	0,9±0,1 $P < 0,01$	1,4±0,1 $P > 0,05$
Гликоген, г%	Печень	1,8±0,1	2,2±0,1 $P < 0,02$	1,3±0,2 $P < 0,05$	3,2±0,3 $P < 0,001$

П р и м е ч а н и е. Число наблюдений в контроле — 15, в опытных сериях — 10.  $P$  — достоверность различия по отношению к контролю;  $P_1$  — достоверность различия по отношению к группе собак с ПДП;  $P_2$  — достоверность различия по отношению к группе собак с ЭАЭ.

Поскольку паралитический синдром при ЭАЭ осложняется недостаточностью внешнего дыхания, то можно было предположить, что нарушение инактивации биогенных аминов в печени может быть связано с угнетением аэробных процессов в ее ткани. В связи с этим мы исследовали содержание в крови и ткани печени МК, пировиноградной кислоты (ПК) и гликогена. Из табл. 3 видно, что в сосудах печени заметно возрастает количество МК, повышается коэффициент МК/ПК, снижается содержание гликогена. Полученные данные свидетельствуют, что при тяжелом ЭАЭ нарушению обмена биогенных аминов сопутствует активация гликолиза и гликогенолиза в печени.

Известно, что биогенные амины и степень оксигенации крови влияют на функциональное состояние печени [20, 21], поэтому в следующей серии экспериментов мы решили уточнить, насколько изменяется желчевыделительная, концентрационная и очистительная функция печени у собак, страдающих ЭАЭ. Результаты опытов (табл. 4) показали, что на фоне развития паралитического синдрома у животных появляется феномен исто-

щения желчевыделения — на протяжении опыта в каждой последующей пробе количество желчи было меньше, чем в контроле. При этом концентрационный показатель и клиренс были снижены во всех пробах. Указанные нарушения можно было рассматривать как результат дыхательной недостаточности, развивающейся при параличе скелетной мускулатуры, однако и у незаболевших животных, у которых паралитический синдром не развивался, в крови и печени также заметно увеличивалось содержание МК и несколько снижалось содержание пирувата. Но активация гликолиза в ткани печени здесь не препятствовала образованию гликогена. При этом содержание гистамина и серотонина в крови не менялось либо снижалось, а их концентрация в печеночной ткани повышалась. Несмотря на указанные нарушения, желчевыделительная, концентрационная и очистительная функции не только не угнетались, но даже значительно возрастали.

Таким образом, изменение содержания биогенных аминов и активности анаэробного гликолиза в печени при ЭАЭ, по-видимому, не определяют нарушение изучаемых функций печеночных клеток; последнее связано, вероятно, с распространенной демиелинизацией нервной системы. Это обстоятельство побудило нас провести исследование на модели другого демиелинизирующего заболевания — ПДП, характеризующегося повреждением иннервационных приборов, в основном мышц заднего пояса, и проявляющегося кратковременными парезами мускулатуры этой части тела без каких-либо явлений асфиксии. Результаты опытов показали, что при ПДП содержание биогенных

Т а б л и ц а 4  
Желчевыделительная, концентрационная и очистительная функции печени у собак при ЭАЭ и ПДП (% к контролю)

Группа животных	Желчевыделение			Концентрационная способность						Очистительная способность		
	исходная величина	время после начала внутривенной перфузии, мин										
		30	60	90	30	60	90	30	60	90		
Заболевание ЭАЭ (n=10) P	296±16,0 <0,001	81,7±4,7 <0,01	71,8±7,3 <0,001	35,1±2,9 <0,001	39,6±1,5 <0,001	49,2±3,7 <0,001	49,6±3,5 <0,001	29,7±2,4 <0,001	38,1±3,5 <0,001			
	93,3±7,9 >0,05 <0,001	163±7,3 <0,001 <0,001	267±8,8 <0,001 <0,001	93,5±7,5 >0,05 <0,001	106±6,9 >0,05 <0,001	184±11,1 <0,001 <0,001	119±9,4 <0,001 <0,001	120±5,5 <0,001 <0,001	276±9,3 <0,001 <0,001			
	60,8±3,3 <0,001 <0,001	60,2±3,3 <0,001 <0,001 <0,001	67,8±3,1 <0,001 >0,05 <0,001	71,4±3,1 <0,001 <0,001 <0,02	58,6±3,7 <0,001 <0,001 <0,01	56,3±2,4 <0,001 >0,05 <0,001	50,5±5,0 <0,001 <0,001 <0,001	56,2±4,4 <0,001 <0,001 <0,001	56,4±3,3 <0,001 <0,001 <0,001			
Животные с ПДП (n=17) P P <sub>1</sub> P <sub>2</sub>												

Примечание. P — достоверность различия по отношению к контролю (до иммунизации); P<sub>1</sub> — достоверность различия по отношению к группе собак, заболевших ЭАЭ; P<sub>2</sub> — достоверность различия по отношению к группе собак без клинической картины ЭАЭ.

аминов в крови не меняется либо снижается, а в печени их концентрация возрастает на фоне несколько повышенной активности гистаминазы. У собак, страдающих ПДП, мы не обнаружили каких-либо существенных изменений содержания ПК и МК в крови и печени. Тем не менее у всех животных мы наблюдали угнетение желчевыделения и снижение концентрации и очистительной функции печени, но оно было выражено в меньшей степени, чем при ЭАЭ.

Таким образом, угнетение желчевыделительной, концентрационной функции печени при ЭАЭ и ПДП связаны, по-видимому, с развитием процессов демиелинизации в нервной системе и нарушением нервного влияния на этот орган. При этом большая степень поражения функции печени при ЭАЭ вызывается, вероятно, воздействием дополнительных факторов, обусловленных асфиксией.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Марков Д. А., Луцинская Н. И., Старостенко Л. И. — Докл. АН Белорусск. ССР, 1966, т. 10, № 5, с. 356—358.
2. Михайлов В. В., Астафьева Н. Г. — Пат. физиол., 1971, № 5, с. 25—29.
3. Сосюкин Ю. П., Орлов С. М., Гулыга Ю. Л. — В кн.: Проблемы аллергии. М., 1971, с. 212—215.
4. Хоружая Т. А. — Вопр. мед. химии, 1975, т. 21, с. 98—102.
5. Албул И. В. — В кн.: Механизмы некоторых патологических процессов. Ростов н/Д., 1968, вып. 2, с. 522—524.
6. Field E. Y. — J. Neuropath. exp. Neurol., 1961, v. 20, p. 185.
7. Levine S., Sowinski R. — Arch. Path., 1969, v. 87, p. 223.
8. Горкин В. З., Акоюн Ж. И., Веревкина И. В. и др. — Биохимия, 1970, № 1, с. 140—151.
9. Fischer I. E., Snyder S. H., Yates I. H. et al. — Ann. Surg., 1972, v. 175, p. 260.
10. Lindhal K. — Acta physiol. scand., 1960, v. 49, p. 114.
11. Frick E. — Z. ges. exp. Med., 1952, Bd 118, S. 274.
12. Cohn V. H., Shore P. A. — Fed. Proc., 1961, v. 20, p. 258.
13. Shore P. A., Burkhalter A., Cohn V. H. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1959, v. 27, p. 182.
14. Snyder S. H., Axelrod Y., Zweig M. — Biochem. Pharmacol., 1965, v. 14, p. 85.
15. Udenfriend S., Titus E., Weissbach H. — J. biol. Chem., 1955, v. 216, p. 499.
16. Barker S. B., Sommerson W. H. — Ibid., 1941, v. 138, p. 535.
17. Friedemann T. E., Haugen G. H. — Ibid., 1943, v. 147, p. 415.
18. Seifter S., Dayton S., Novik B. et al. — Arch. Biochem., 1950, v. 25, p. 191.
19. Brauer R. W., Pessoti R. L. — Am. J. Physiol., 1950, v. 162, p. 565.
20. Венгер И. К. — Бюлл. exper. биол., 1972, № 12, с. 16—18.

Поступила 10/VI 1977 г.

#### BIOGENIC AMINES AND THE FUNCTIONAL STATE OF DOG LIVER TISSUE IN EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS AND IN POSTDIPHHTHERITIC POLYNEURITIS

V. V. Mikhailov, N. N. Otdel'nova

Institute of Stomatology, Moscow, Medical School, Saratov

Severity of paralytic syndrome correlated with impairments in some functions of liver tissue (bile secretion, concentrating and detoxicating capacities) as well as with content of biogenic amines, lactic and pyruvic acids in liver and in blood, flowing in and out the liver tissue in dogs with experimental allergic encephalomyelitis and with postdiphtheritic polyneuritis. The alterations observed were due to development of demyelination in the nerves and to the effects of additional factors, caused by insufficiency in external respiration.

А. Прашкявичюс, Л. Лукошывичюс, В.-Н. Йокубаускаене

## АЦЕТИЛИРОВАНИЕ СУЛЬФАНИЛАМИДА И СОДЕРЖАНИЕ КОФЕРМЕНТА А В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ И ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НЕКРОЗЕ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Каунасский медицинский институт

*Окклюзия коронарных артерий в первые сутки подавляет интенсивность ацетилирования сульфаниламида и уменьшает содержание кофермента (КоА) А в миокарде и печени. В течение 1—6 сут после окклюзии ацетилирование сульфаниламида и содержание КоА в исследуемых тканях увеличиваются. К 12-м суткам ацетилирование в миокарде нормализуется, а в печени остается увеличенным. Содержание КоА колеблется в пределах нормы.*

Интенсивность реакций ацетилирования в тканях зависит как от количества кофермента (КоА) А, так и от состояния всей сложной ферментной системы ацетилирования, компоненты которой распределены во всех частях клетки [1, 2].

В литературе имеются отдельные работы, освещающие процессы ацетилирования и содержание КоА в отдельных органах в норме и при различной патологии [3—8]. Однако сведений об изучении этих показателей при развитии некроза сердечной мышцы в доступной нам литературе найти не удалось.

Целью нашей работы является изучение ацетилирования сульфаниламида *in vivo* и содержания КоА в некротической и интактной зонах сердечной мышцы и печени после воспроизведения экспериментального некроза сердечной мышцы (ЭНСМ).

### Методика

В работе использовали кроликов-самцов массой 2,5—3,5 кг, находящихся в одинаковых условиях вивария. Животные были распределены на 2 группы: в 1-й группе животных исследовали ацетилирование сульфаниламида *in vivo*, во 2-й — ацетилирование парааминобензойной кислоты (ПАБК) *in vitro* (определяли содержание КоА в тканях). Каждая группа животных была разделена на следующие подгруппы: а) интактные животные; б) тораотомированные животные, которых умерщвляли через 1, 3, 6, 9, 12 и 24 ч после оперативного вмешательства; в) животные, исследованные через 1, 3, 6, 9 и 12 ч и 1, 3, 6, 9 и 12 сут после окклюзии коронарной артерии.

Некроз сердечной мышцы воспроизводили временной (60 мин) окклюзией левой нисходящей ветви венечной артерии [9]. Развитие ЭНСМ контролировали электрокардиографически и гистологически.

Об интенсивности ацетилирования судили по ацетилированию сульфаниламида, введенного животному внутривенно. Количество ацетилированного сульфаниламида в тканях определяли по методу Хельмрика и соавт., модифицированному Ситинской [10]. С этой целью животному вводили теплый (45°C) раствор сульфаниламида, приготовленный на 1,5% глюкозе, из расчета 30 мг сульфаниламида на 100 г массы. Через 30 мин после инъекции кроликов умерщвляли, изучаемую ткань быстро извлекали, навеску отмытой от крови ткани измельчали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с водой. В гомогенатах тканей определяли количество свободного и ацетилированного сульфаниламида. Интенсивность ацетилирования выражали в микрограммах ацетилированного сульфаниламида на 1 мг белка, определяемого методом Лоури [11].

О содержании КоА судили по скорости ацетилирования ПАБК прокипяченным экстрактом исследуемых тканей. Определение проводили по методу Каплана и Липмана [12] с ранее указанными модификациями [13]. Скорость ацетилирования выражали в микрограммах ацетилированной ПАБК на 1 мг белка за 1 мин.

### Результаты и обсуждение

Окклюзия коронарных артерий и развивающийся вследствие этого очаг некроза в миокарде нарушают снабжение кислородом сердечной мышцы, печени, почек, мозга и других органов [14]. В результате этого нарушают-

ся окислительно-восстановительные процессы в тканях, что должно отражаться на реакции ацетилирования и содержании КоА.

Полученные данные представлены в табл. 1 и 2. Поскольку влияние торакотомии на скорость ацетилирования ПАБК до 24 ч является значительным, то в течение 1 сут за контроль принимали торакотомированных животных.

Т а б л и ц а 1

Ацетилирование сульфаниламида (в мкг на мг белка за 30 мин) в сердечной мышце и печени кроликов при развитии ЭНСМ

Длительность ЭНСМ	Животные	Число животных	Ацетилированный сульфаниламид		
			сердечная мышца		печень
			некротическая зона	интактная зона	
1 ч	Интakтные	9	—	0,221±0,016	0,349±0,023
	I	6	—	0,226±0,021	0,305±0,019
	II	6	0,171±0,012	0,162±0,014	0,359±0,014
	P		<0,01	<0,05	<0,05
3 ч	I	7		0,254±0,018	0,336±0,011
	II	7	0,163±0,019	0,214±0,015	0,519±0,023
	P		<0,01	>0,1	<0,001
6 ч	I	7		0,257±0,009	0,328±0,018
	II	7	0,180±0,013	0,202±0,008	0,529±0,015
	P		<0,001	<0,001	<0,001
9 ч	I	7		0,254±0,018	0,310±0,016
	II	7	0,205±0,014	0,216±0,015	0,438±0,009
	P		<0,05	>0,1	<0,001
12 ч	I	7		0,243±0,017	0,321±0,020
	II	7	0,212±0,014	0,219±0,016	0,428±0,018
	P		<0,05	>0,2	<0,01
1 сут	I	7		0,220±0,018	0,346±0,019
	II	7	0,288±0,018	0,290±0,009	0,418±0,021
	P		<0,02	<0,01	<0,05
3 сут	II	7	0,293±0,021	0,296±0,015	0,534±0,034
	P		<0,02	<0,01	<0,001
	II	7	0,279±0,013	0,282±0,016	0,487±0,015
6 сут	P		<0,02	<0,02	<0,001
	II	7	0,257±0,016	0,264±0,015	0,462±0,024
	P		>0,1	>0,1	<0,01
9 сут	II	7	0,236±0,018	0,224±0,020	0,489±0,007
	P		>0,8	>0,8	<0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2: I — животные, у которых была выполнена торакотомия, II — животные с ЭНСМ; P вычислено по сравнению с контролем.

В дальнейшем контролем служили интактные животные.

В течение первых часов после окклюзии коронарных сосудов ацетилирование сульфаниламида и содержание КоА как в ишемической, так и в интактной зоне сердечной мышцы уменьшаются. Наиболее выраженное уменьшение ацетилирования (35,2 и 29,9%) в ишемической зоне миокарда происходит через 3—6 ч после воспроизведения ЭНСМ, а в интактной зоне — через 1 и 6 ч (28,4 и 21,3% соответственно). В то же время через 6 ч содержание КоА в некротической зоне уменьшается на 52,2%, а в интактной — на 30,9%. К 12-му часу эксперимента наблюдается тенденция к нормализации реакции ацетилирования в обеих зонах миокарда, а к 24-му часу интенсивность ацетилирования сульфаниламида у подошгных животных становится достоверно повышенной (30,5%). На 3—6-е сутки эксперимента интенсивность ацетилирования сульфаниламида и содержание КоА в сердечной мышце остаются достоверно повышенными, а к концу эксперимента возвращаются к контрольным величинам. Аналогичная направленность наблюдается и в изменении содержания КоА в сердечной мышце. При этом следует отметить, что уменьшение интенсивности ацетилирования суль-

фаниламида и содержания КоА в первые часы после воспроизведения ЭНСМ является более выраженным в ишемической зоне, чем в интактной (рис. 1 и 2).

Гипоксия, развивающаяся при ЭНСМ, затрагивает процессы ацетилирования не только в сердечной мышце, но и в печени, где, по нашим данным, интенсивность ацетилирования сульфаниламида в первые часы эксперимен-

Т а б л и ц а 2

Ацетилирование ПАБК (в мкг на 1 мг белка за 1 мин) в сердечной мышце и печени кроликов при развитии ЭНСМ

Длительность ЭНСМ	Животные	Число животных	Ацетилированная ПАБК		
			сердечная мышца		печень
			некротическая зона	интактная зона	
1 ч	Интактные	8	—	14,0±0,43	25,0±2,01
	I	6		26,7±1,67	41,2±0,94
3 ч	II	6	22,1±1,99	23,7±1,08	38,6±2,04
	P		>0,1	>0,1	>0,2
6 ч	I	6	23,4±0,50	26,4±0,72	43,9±1,48
	II	7	8,87±0,48	12,8±1,18	23,8±2,19
9 ч	P		<0,01	<0,05	<0,001
	I	6	12,8±0,39	13,7±0,55	37,0±1,58
12 ч	II	7	17,0±0,71	21,0±1,51	38,0±0,48
	P		<0,05	>0,6	>0,6
1 сут	I	6	10,5±0,58	14,2±2,49	24,8±2,80
	II	7	24,3±1,97	13,5±0,43	23,6±1,71
3 сут	P		<0,001	>0,2	>0,6
	II	8	19,5±1,10	26,9±4,55	34,1±2,98
6 сут	P		<0,001	<0,02	<0,05
	II	7	13,1±1,12	19,2±2,23	32,1±1,38
9 сут	P		<0,001	<0,05	<0,05
	II	6	13,1±1,12	14,2±1,32	24,2±0,89
12 сут	P		>0,4	>0,8	>0,8
	II	8	13,6±1,17	13,2±0,85	26,8±1,63
	P		>0,8	>0,6	>0,4

та увеличивается (рис. 3). Наиболее активным (на 54,3 и 61,2% выше контроля) процесс ацетилирования становится через 3—6 ч после окклюзии коронарных сосудов. Некоторая тенденция к нормализации отмечается через 24 ч, но в дальнейшем интенсивность ацетилирования сульфаниламида опять увеличивается и остается повышенной до конца эксперимента. При изучении содержания КоА в печени при ЭНСМ отмечается волнообразное его изменение. В первые часы эксперимента наблюдается тенденция к уменьшению, что наиболее выражено к 6-му часу, где уменьшение составляет 36,7%. В дальнейшем содержание КоА возвращается к контрольным величинам, а на 3-и сутки ЭНСМ повышается на 36,0%. Через 6 сут содержание КоА увеличивается на 28,8%, а через 9 и 12 сут оно не отличается от контроля.

Так как ацетилирующую способность тканей определяли методом нагрузки сульфаниламидом с максимальным вовлечением ферментных систем, обеспечивающих ацетилирование ароматических аминов, пониженное количество ацетилсульфаниламида в миокарде может быть обусловлено несколькими факторами, самыми важными из которых являются синтез КоА и содержание АТФ, цитрата, ацетата, цистина и ферментного белка. Резкое уменьшение содержания КоА в сердечной мышце и печени, по-видимо-

му, может быть обусловлено гипоксией и нарушением обмена веществ в сердечной мышце. Это согласуется с работами авторов, отметивших уменьшение содержания КоА при гипоксических условиях в сердечной мышце и печени [15, 16]. При остром

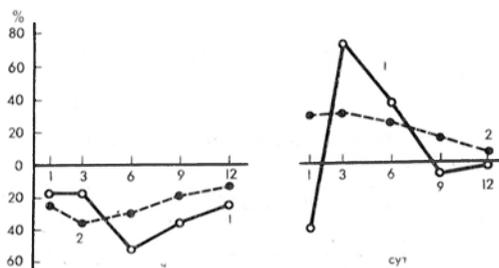


Рис. 1. Изменение содержания КоА (1) и ацетилирования сульфаниламида (2) в некротической зоне сердечной мышцы после воспроизведения ЭНСМ.

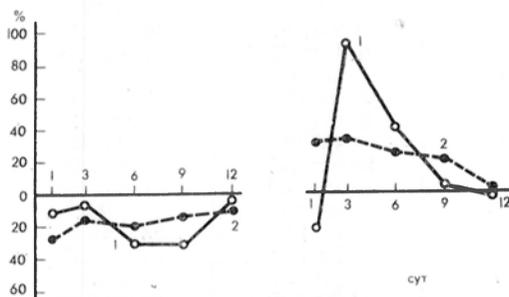


Рис. 2. Изменение содержания КоА (1) и ацетилирования сульфаниламида (2) в интактной зоне сердечной мышцы после воспроизведения ЭНСМ.

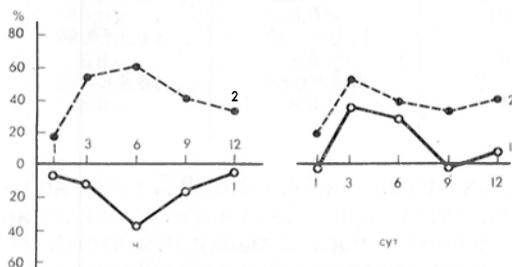


Рис. 3. Изменение содержания КоА (1) и ацетилирования сульфаниламида (2) в печени после воспроизведения ЭНСМ.

редetermined влияние на ацетилирование сульфаниламида и содержание КоА оказывает и активация кортико-адреналовой функции при некрозе сердечной мышцы.

инфаркте миокарда наблюдается уменьшение продукции инсулина, содержания макроэргов [17], а также изменение содержания катехоламинов [18, 19]. В то же время установлено, что введение крысам адреналина вызывает уменьшение содержания КоА в сердце, печени и других органах [20]. Исходя из этого, можно предположить, что гиперкатехоламинемия в какой-то степени обуславливает уменьшение содержания КоА, которое может привести к подавлению ацетилирования сульфаниламида в миокарде. Не исключено также, что при ЭНСМ в течение первых часов уменьшается и активность ариламинацетилазы сердечной мышцы.

В остром ишемическом периоде интенсивность ацетилирования сульфаниламида в печени увеличивалась, в то время как содержание КоА уменьшалось. Известно, что печень обладает большой приспособляемостью к действию повреждающих факторов. Вероятно, при гипоксических условиях печень отвечает повышением ацетилирующей способности.

Усиление ацетилирования сульфаниламида в печени после окклюзии коронарных артерий может способствовать повышению антитоксической и адаптационно-компенсаторной функций печени за счет активации энзиматической системы ацетилирования. Вероятно, оп-

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Филиппова В. Н., Сейц И. Ф. — Биохимия, 1960, № 4, с. 716.—
2. Schaubeau J., Le Van Hung. — Arch. Sci. Physiol., 1953, v. 7, p. 19.—
3. Крылов Ю. Ф., Дунаев В. В. — Фармакол. и токсикол., 1970, № 1, с. 82.—
4. Калужная Р. А., Черномордик А. Е., Воскресенская Г. С. и др. — Вопр. охр. мат., 1969, № 7, с. 19.—
5. Le Van Hung, Andrieux C. — C. R. Acad. Sci. (Paris), 1973, v. 276-D, p. 781.—
6. Tanaka Hidehiko, Soda Kenji. — J., Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 5285.—
7. Ibrahimi I. M., Ga-

- briel M. A., Al-Kbalidi U. S. A. — *Int. J. Biochem.*, 1972, v. 3, N 14, p. 161. — 8. Pogo B. G., T., Pogo A. O., Allgei V. G. — *Genetics*, 1969, v. 61, Pt 2, p. 373. — 9. Виткус А. С. Экспериментальный инфаркт миокарда, эффективность его предупреждения и стимуляции восстановительных процессов. Дис. докт. Каунас, 1968. — 10. Сытинская О. Н. — *Вопр. мед. химии*, 1956, № 3, с. 214. — 11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 139, p. 265. — 12. Карпан Н. О., Лирманн Г. — *Ibid.*, 1948, v. 174, p. 37. — 13. Йокубаускаене Н. Л. — В кн.: *Методы в биохимии*. Вильнюс, 1975, с. 317. — 14. Вениг Г. П. — *Труды Казанск. мед. ин-та*, 1971, т. 41а, с. 172. — 15. Мозговая И. А. Влияние гипоксии на ацетилирование сульфаниламида и на образование кетоновых тел в печени белых крыс. Автореф. дис. канд. Л., 1968. — 16. Осипова Л. Н., Мережинский В. М. — В кн.: *Биохимия*, Минск, 1974, вып. 2, с. 42. — 17. Прашкявичюс А. К., Лукошявичюс Л. И., Шмидт А. А. — В кн.: *Успехи гепатологии*, Рига, 1971, вып. 3, с. 292. — 18. Гороховский Б. И., Лукичева Т. И. — *Кардиология*, 1972, № 11, с. 111. — 19. Шушлянин О. И. — Там же, 1975, № 4, с. 140. — 20. Шебеко Г. С. — *Укр. біохім. ж.*, 1970, № 5, с. 596.

Поступила 15/VI 1977 г.

## ACETYLATION OF SULFANILAMIDE AND CONTENT OF COENZYME A IN HEART AND LIVER TISSUE IN EXPERIMENTAL NECROSIS OF HEART MUSCLE

A. Prashkyavichus, L. Lukoshyavichus, V. N. Yokubauskene

Medical School, Kaunas

Sulfanilamide acetylation was inhibited and content of CoA was decreased in myocardium and liver tissue within the first day after occlusion of coronary arteries. Within 1-6 days after the occlusion the sulfanilamide acetylation and content of CoA were increased in the tissues studied; at the 12<sup>th</sup> day the reactions of acetylation were normalized in myocardium but remained at an increased level in the liver tissue. The content of CoA was similar to the values found in the normal state.

УДК 616.155.392-092.9-07:616.42-008.931:577.152.322

А. И. Свирновский, Т. В. Шиманская, В. И. Левин, А. В. Бакун

## НУКЛЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ЛЕЙКОЗНО ИЗМЕНЕННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ

Белорусский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови, Минск

*Изучена активность ДНК-азы I, ДНК-азы II, РНК-азы I и РНК-азы II в тимусе и селезенке мышей высоколейкозной линии АКР и низколейкозной С57В1 2- и 6-месячного возраста, а также при спонтанном лейкозе мышей АКР, в селезенке мышей АКР с первой и многократной генерацией этого лейкоза, в селезенке мышей С57В1 после перевивки им стандартного штамма лейкоза La. Установлено неоднаправленное и несопряженное изменение ферментативной активности в процессе развития лейкоза и опухолевой прогрессии.*

Интерес к изучению нуклеаз при опухолевом росте, в частности при лейкозах [1—4], определяется их значением в метаболизме нуклеиновых кислот [5, 6]. Однако заключение об изменении нуклеазной активности в опухолях и прежде всего о ее снижении базируется на фактах и представлениях, которые нуждаются в дополнительном анализе, возможном при получении данных динамического наблюдения за изменением активности этой группы ферментов в предопухолевой и опухолевой ткани на различных этапах заболевания. В связи с этим мы провели комплексное исследование активности ДНК-азы I (деоксирибонуклеат 5'-олигонуклеотидогидролаза, КФ 3.1.4.5.), ДНК-азы II (деоксирибонуклеат 3'-олигонуклеотидогидролаза, КФ 3.1.4.6), РНК-азы I (рибонуклеат 3'-пиримидинолигонуклеотидогидролаза, КФ 3.1.4.22) и РНК-азы II (рибонуклеат 3'-олигонуклеотидогидролаза, КФ 3.1.4.23) в лимфоидной ткани в процессе становления и развития лейкоза, а также в период прогрессии опухолевых свойств лейкозных клеток.

## Методика

Опыты выполнены на мышах линии АКР, болеющих спонтанным лейкозом во втором полугодии жизни, и мышах низколейкозной линии С57В1 (400 животных). Активность ферментов определяли в гомогенатах тимуса и селезенки 2- и 6-месячных животных обеих линий (т. е. у здоровых мышей и в предлейкозном для линии АКР периоде), при спонтанном лейкозе АКР, в селезенке мышей АКР с лейкозом первой генерации, развившимся после трансплантации клеток спонтанного лейкоза сингенным животным, а также с длительно пассированным лейкозом, в селезенке мышей С57В1 с перевиваемым штаммом лейкоза La. Эти формы лейкоза характеризуются различной скоростью роста составляющих их морфологический субстрат клеток, которые находятся на разных стадиях опухолевой прогрессии.

Определение гистогенетических признаков лейкозных клеток имело важное значение для установления исходных органов, клетки которых подверглись опухолевой трансформации. Тип лейкоза определяли в препаратах, окрашенных по Романовскому — Гимзе, и с помощью цитохимических реакций на гликоген, пероксидазу, липиды, кислую фосфатазу, неспецифическую эстеразу, а также с помощью теста цитотоксичности путем обработки взвеси лейкозных клеток антисывороткой, содержащей антитела к тета-антигену.

При спонтанном лейкозе АКР трансформация клеток происходила на уровне предшественников тимоцитов. Лейкозные клетки, выделенные из увеличенного тимуса, сохраняли на своей поверхности тета-антиген, характерный для Т-клеток. Аналогичные клетки инфильтрировали селезенку, в которой в 2 раза увеличивалось число тета-положительных клеток. При пассировании лейкоза в первой и последующей генерациях Т-принадлежность лейкозных клеток сохранялась. Если гликоген при спонтанном лейкозе выявлялся только в 14% клеток селезенки, то в последующих генерациях количество PAS-положительных клеток возрастало в 2 и более раз. Эти данные также подтверждают лимфоидный тип лейкоза у мышей АКР. Одновременно лейкозные клетки у мышей АКР, как и у С57В1, давали отрицательные реакции на пероксидазу, липиды, кислую фосфатазу и неспецифическую эстеразу. 38% клеток лейкоза La содержали гликоген в крупногранулярной форме, но не имели на своей поверхности тета-антигена (он выявлялся только у 3% клеток). Это может быть обусловлено отсутствием субпопуляционной дифференцировки лимфоидных клеток при этой форме лейкоза либо их принадлежностью к клеткам В-типа.

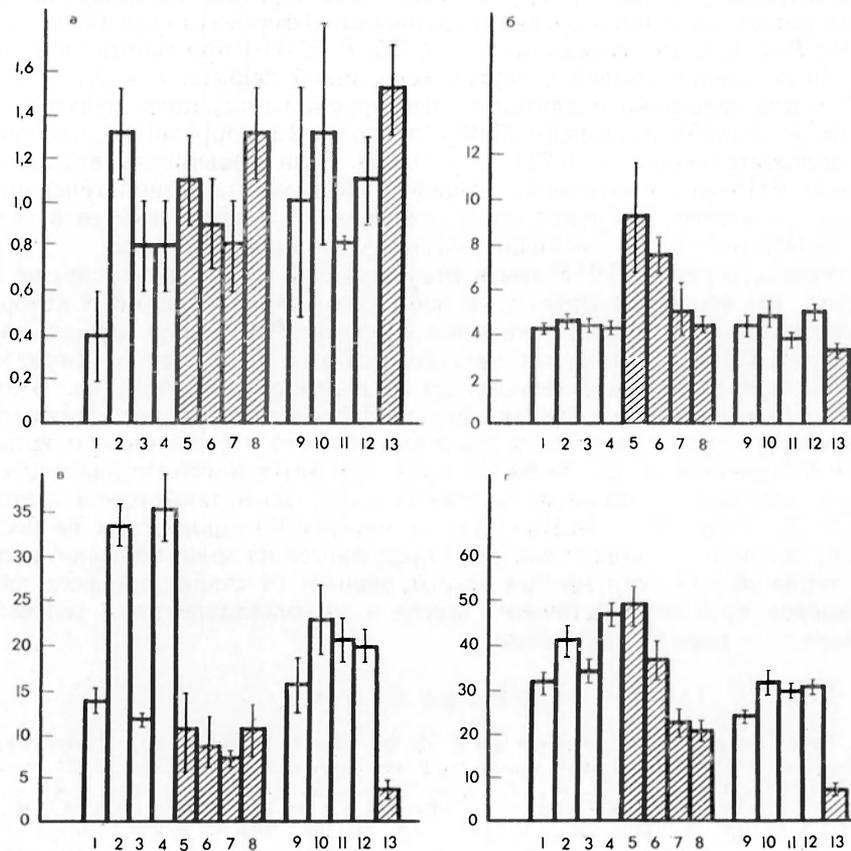
В основу определения активности нуклеаз положен метод [7] с модификациями применительно к объекту исследования [8]. О нуклеазной активности судили по накоплению в гомогенатах кислоторастворимых продуктов ферментативного распада добавленных в пробы ДНК или РНК. Использовали препараты высокомолекулярной ДНК из эритроцитов цыплят (фирма «Reanal», Венгрия) и препараты дрожжевой РНК (фирма «Sigma», США). Последние перед опытом очищали [9]. Для определения ДНК-аз использовали 5% водные гомогенаты тканей, для определения РНК-аз — 2,5% гомогенаты. Содержание ДНК в пробах 0,23 мг/мл, РНК 0,3%. Пробы инкубировали 30 мин при 37°C в фосфатном буфере рН 5,6 или 7,8 для РНК-аз и в трис-буфере рН 7,5 или ацетатном буфере рН 5,5 для ДНК-аз. В трис-буфер вносили ионы магния. При определении РНК-азной активности реакцию останавливали с помощью 0,75% раствора уксуснокислого уранила в 25% хлорной кислоте, при определении ДНК-аз — добавлением 12% хлорной кислоты. В контроле гомогенаты и нуклеиновые кислоты инкубировали отдельно. Расчет вели по приросту поглощения в пробах при 260 нм на 1 мг белка, который определяли по Лоури [10].

## Результаты и обсуждение

Активность ДНК-азы I в тимусе мышей АКР в предлейкозном периоде повышается в 2 раза по сравнению с ее величиной у 2-месячных животных (см. рисунок). Сопоставление с аналогичными данными у мышей низколейкозной линии, у которых активность фермента достоверно не изменяется, позволяет считать, что наблюдаемые сдвиги обусловлены не просто возрастными изменениями в тимусе, а характерны для предлейкозного периода. Еще больше увеличивалась активность ДНК-азы I в тимусе при спонтанном лейкозе, свидетельствуя о том, что лейкозная трансформация клеток тимуса сочетается с повышением активности фермента. Этому заключению не противоречит факт снижения активности фермента в селезенке по мере приближения к заболеванию лейкозом и при уже развившемся лейкозе, так как при спонтанном лейкозе происходит, как уже отмечалось, инфильтрация селезенки, в которой в норме обнаруживается высокая активность ДНК-азы I, клетками тимусного происхождения с более низкой ферментативной активностью. По-видимому, различия, обнаруживаемые в норме

между двумя лимфоидными органами, отражают функциональную и биохимическую гетерогенность сходных в морфологическом отношении клеток тимуса и селезенки. Этот вывод базируется и на проведенных ранее исследованиях других биохимических показателей, изменяющихся в процессе развития экспериментального лейкоза [11].

В период опухолевой прогрессии (при многократно пассируемых лейкозах АКР и С57В1) активность ДНК-азы I в селезенке возрастает, однако и в этих случаях она не отличается достоверно от активности фермента в нормальной селезенке. Вместе с тем следует специально подчеркнуть наличие достоверной обратной корреляции между активностью фер-



Активность нуклеаз в лимфоидной ткани мышей при лейкозе.

*a-g* — активность ДНК-азы I, ДНК-азы II, РНК-азы I и РНК-азы II соответственно. По оси ординат — активность ферментов ( $\Delta E_{260}$  на 1 мг белка в 30 мин); по оси абсцисс: 1 и 2 — соответственно тимус и селезенка 2-месячных мышей АКР, 3 и 4 — тимус и селезенка 6-месячных мышей АКР 5 и 6 — тимус и селезенка мышей АКР со спонтанным лейкозом; 7 — селезенка мышей АКР с первой генерацией лейкоза; 8 — селезенка мышей АКР с многократно пассируемым лейкозом; 9 и 10 — соответственно тимус и селезенка 2-месячных мышей С57В1; 11 и 12 — тимус и селезенка 6-месячных мышей С57В1; 13 — селезенка мышей С57В1 с перевитым лейкозом La.

мента и размерами лейкозной инфильтрации в тимусе ( $r = 0,567$ ;  $P < 0,05$ ) и селезенке ( $r = 0,656$ ;  $P < 0,05$ ) при спонтанном лейкозе, в селезенке мышей АКР при длительно пассируемом лейкозе ( $r = 0,664$ ;  $P < 0,05$ ) и в селезенке мышей С57В1 при лейкозе La ( $r = 0,782$ ;  $P < 0,01$ ).

Активность ДНК-азы II в предлейкозном периоде у мышей АКР существенно не изменяется, но повышается при спонтанном лейкозе, а затем в процессе опухолевой прогрессии снижается до нормальных величин. При быстро развивающемся лейкозе La, клетки которого в течение более длительного времени подвергались опухолевой прогрессии, активность ДНК-

азы II оказалась ниже нормального уровня. Однако и здесь отмечается обратная корреляция между активностью фермента и массой лейкозно измененной селезенки ( $r = 0,836$ ;  $P < 0,001$ ).

Резко выраженные различия в активности щелочной РНК-азы в тимусе и селезенке 2-месячных мышей АКР обусловили неодинаковую степень ее изменения в этих органах и при спонтанном лейкозе. Важно подчеркнуть, что в тимусе не наблюдалось достоверных изменений активности фермента ни в предлейкозном периоде, ни при спонтанном лейкозе. Правда, нужно отметить, что по мере старения у мышей С57В1, не заболевших лейкозом, активность этого фермента повышается. Снижение активности щелочной РНК-азы в лейкозно измененной селезенке очень велико. Однако при всех формах лейкоза у мышей АКР констатирована обратная достоверная корреляция между величиной органа и активностью фермента (для тимуса  $r = 0,515$ ;  $P < 0,1$ , для селезенки  $r = 0,775$ ;  $P < 0,01$  при спонтанном лейкозе; для селезенки мышей с первой генерацией лейкоза  $r = 0,700$ ;  $P < 0,05$  и для селезенки с длительно пассируемой генерацией лейкоза  $r = 0,719$ ;  $P < 0,05$ ). У мышей С57В1 с лейкозом La корреляция, наоборот, была положительной ( $r = 0,711$ ;  $P < 0,05$ ). Если сравнивать активность щелочной РНК-азы в селезенке мышей АКР с многократной генерацией лейкоза, имеющего тимусное происхождение, с активностью ее в ткани нормального тимуса, то различия оказываются минимальными.

Активность кислой РНК-азы в тимусе мышей АКР с возрастом не повышается, как это наблюдается у мышей низколейкозной линии, у которых возрастная атрофия тимуса сочетается с ростом РНК-азной активности в этом органе. Однако активность кислой РНК-азы возрастает в тимусе мышей АКР при спонтанном лейкозе, но не изменяется в селезенке. В процессе опухолевой прогрессии активность фермента отчетливо снижается, что подтверждается и очень низкой активностью его в селезенке при лейкозе La, преобладающая часть клеток которого находится в митотическом цикле.

Таким образом, изменение активности нуклеаз в лимфоидной ткани в процессе опухолевой трансформации и прогрессии происходит не всегда односторонне и сопряженно. Это определяется их многообразной ролью в регуляции обмена нуклеиновых кислот, зависит от стадии процесса, часто от размеров органов, клеточного цикла и от сопоставления с соответствующими исходными величинами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко З. А., Глузман Д. Ф., Зак К. П. и др. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. Киев, 1974, с. 18—20.
2. Chkgabarty A. K., Seglowski W. S., Friedman H. — Cancer Res., 1970, v. 30, p. 617—624.
3. Manson P. E., Deuesch A., Norden A. — Scand. J. Haemat., 1974, v. 12, p. 284—289.
4. Zöllner E. J., Beck J. D., Lemel E. M. et al. — Cancer Letters, 1971, v. 1, p. 119—126.
5. Татарская Р. И. — Молекулярная биол., 1976, № 2, с. 235—259.
6. Шапот В. С. Нуклеазы. М., 1968, с. 3—20.
7. Schneider W. S., Hogeboom G. H. — J. Biol. Chem., 1952, v. 193, p. 155—163.
8. Шапот В. С., Чудинова И. А., Кречетова Г. Д. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1964, т. 1, с. 267—281.
9. Frisch-Niggemeyer W., Reddi K. K. — Biochim. biophys. Acta., 1957, v. 26, p. 40—46.
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
11. Свириновский А. И., Леви В. И. — Вопр. онкол., 1971; № 3, с. 71—73.

Поступила 2/XI 1977 г.

#### NUCLEASE ACTIVITY IN LEUKEMIC LYMPHOID TISSUE

A. I. Svirnovsky, T. V. Shimanskaya, V. I. Levin, A. V. Bakun

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Minsk

Activities of DNAase I, DNAase II, RNAase I and RNAase II were altered in lymphoid tissue during development of lymphoid leukosis in mice of AKR strain, during survival of the leukemic cells as well as in leukemic spleen tissue of mice C57B1 with transplantable

leukosis La. The enzymatic activity correlated with the step of the process, the rate of leukemic cells proliferation, with dimensions of organs. Variations in the enzymatic activity, as compared with normal state, were dissimilar in development of leukosis; activity of the enzymes was either increased or decreased apparently due to their multiple functions in metabolism of nucleic acids.

УДК 616.13-004.6-07:616.153.963'915-074

Е. Н. Левитова, Н. М. Лобова

## РАСЩЕПЛЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИДЛИПАЗОЙ ФРАКЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ ЛЮДЕЙ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Институт кардиологии  
АМН СССР им. А. Л. Мясникова, Москва

*Изучали расщепление in vitro липопротеидлипазой фракции липопротеидов очень низкой плотности (ЛОНП) с  $s_f$  100—400 S сыворотки крови больных атеросклерозом и здоровых людей. У значительной части обследованных больных обнаружено уменьшение интенсивности расщепления фракции ЛОНП по сравнению с интенсивностью расщепления этой фракции у здоровых лиц. Низкие уровни расщепления ЛОНП чаще всего наблюдались у больных с повышенной концентрацией ЛОНП в сыворотке крови. Высказано предположение о неравномерном увеличении содержания отдельных компонентов, входящих в состав фракции ЛОНП с  $s_f$  100—400 S, при гиперлипопропротеидемии.*

В патогенезе атеросклероза существенную роль играют липопротеиды плазмы крови. Показано, что липопротеиды, относящиеся к классам очень низкой плотности (ЛОНП) и низкой плотности (ЛНП), могут проникать в стенку сосудов и откладываться там, принимая участие в формировании атероматозных бляшек [1—3]. Не исключена возможность того, что одним из факторов, способствующих отложению липопротеидов, может являться изменение состава фракций липопротеидов в целом или отдельных их компонентов. Имеющиеся в литературе данные по этому вопросу немногочисленны и неоднозначны [4—8]. Наличие подобных изменений должно сказаться на характере расщепления липопротеидов соответствующими липазами. Поэтому мы предприняли сравнительное изучение in vitro гидролиза липопротеидлипазой ЛОНП ( $s_f$  100—400 S) сыворотки крови больных атеросклерозом и здоровых людей. Предварительное сообщение об этой работе было опубликовано ранее [9].

### М е т о д и к а

Исследование проводили у 62 больных атеросклерозом коронарных артерий мужчин в возрасте от 30 до 62 лет, находившихся на лечении в клинике Института кардиологии АМН СССР им. А. Л. Мясникова. Основанием для диагноза атеросклероза коронарных артерий служили типичные приступы стенокардии, перенесенный инфаркт миокарда, подтвержденный ЭКГ, а также данные коронароангиографии. У больных не отмечалось признаков недостаточности кровообращения и исключались заболевания, дающие вторичную гиперлипопропротеидемию (ГЛП), — диабет, гипотиреоз, нефротический синдром, алкоголизм. Обследованные находились на обычной для них диете (стол № 10 по Певзнеру) и не получали каких-либо препаратов, влияющих на уровень липидов в крови. Кровь для исследования брали вне приступов стенокардии и не ранее чем через 4—6 мес от момента перенесенного инфаркта. Контрольную группу составили 22 донора (мужчины в возрасте 25—35 лет), признанные практически здоровыми при амбулаторных обследованиях. У доноров отсутствовали клинические признаки атеросклероза и такие риск-факторы, как гипертония, ожирение, ГЛП.

У больных и здоровых мужчин определяли содержание отдельных классов липопротеидов в сыворотке крови с помощью аналитического ультрацентрифугирования [10] и при наличии ГЛП классифицировали ее по Фредриксону [11]. Результаты исследований показали, что из 62 больных у 11 была ГЛП типа IIa, у 23 — типа IIb, у 17 — типа IV. У 11 больных ГЛП отсутствовала.

Расщепление *in vitro* липопротеидлипазой фракции ЛОНП с *sf* 100—400 S, полученной от здоровых и больных атеросклерозом людей

Исследуемый показатель	Здоровые	Больные				без ГЛП
		с ГЛП				
		все типы больных	IIa	IIб	IV	
Выход свободных жирных кислот, мкмоль за 20 мин <i>n</i> 51 <i>P</i> < 0,02	1,70 ± 0,05 22	1,37 ± 0,07 51 < 0,02	1,59 ± 0,15 11 > 0,1	1,44 ± 0,11 23 < 0,05	1,13 ± 0,11 17 < 0,001	1,55 ± 0,15 11 > 0,1
Снижение выхода жирных кислот, %		19,4	6,5	15,3	33,5	8,8

Примечание. *n* — число людей; *P* — уровень значимости по сравнению с группой здоровых лиц.

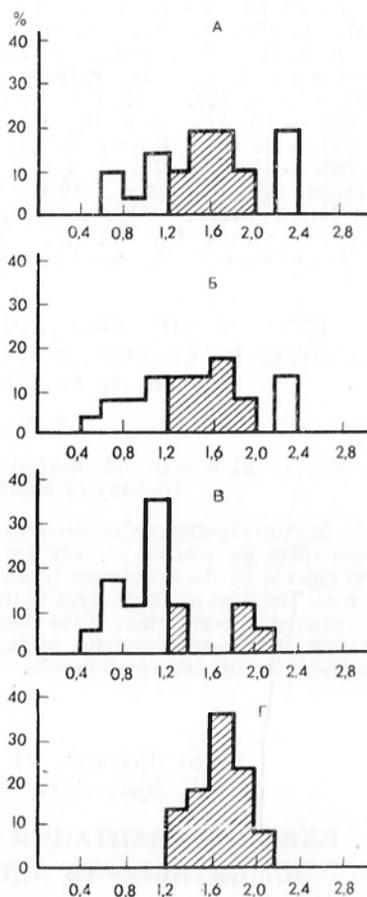
Фракцию ЛОНП с *sf* 100—400 S выделяли препаративным ультрацентрифугированием по Густафсону [12]. Чистоту выделенной фракции проверяли с помощью аналитического ультрацентрифугирования. Концентрацию фракции ЛОНП определяли по площади пиков на диаграммах флотации [13]. Липопротеидлипазу выделяли из постгепариновой плазмы крыс путем образования комплекса с субстратом (интралипидом) и последующей солюбилизации фермента, как описано у Филдинга [14]. Был получен фермент с удельной активностью 6—8 ед. на 1 мг белка. Об интенсивности расщепления ЛОНП судили по количеству микромоль свободных жирных кислот, образующихся за 20 мин реакции, с помощью рН-стата фирмы «Радиометр» при рН 8,0 и 37°C. Титрование проводили 0,02 н. NaOH. В ячейку прибора вносили 2,7 мл 0,145 М NaCl, подщелоченного до рН 8,0 и содержащего 140 мг бычьего сывороточного альбумина. Туда же добавляли 0,7 мл раствора ЛОНП (1 мг). Устанавливали рН инкубационной смеси равным 8,00 с помощью 0,1 н. NaOH. Расщепление липопротеидов начинали, добавляя в пробу 0,1 мл раствора фермента с активностью 0,12 ед. Общий объем смеси составлял 3,5 мл. Активность фермента определяли в аналогичных условиях, но субстратом при этом служил интралипид, активированный сывороткой крысы [15], в количестве 24 мг триглицеридов на 1 мл инкубационной смеси, как указано ранее [16]. За единицу активности фермента принимали его количество, которое освобождает 1 мкмоль свободных жирных кислот за 1 мин при расщеплении активированного интралипида.

## Результаты и обсуждение

Из таблицы следует, что уровень расщепления фракции ЛОНП, полученных от больных атеросклерозом, достоверно ниже такового у здоровых людей. Правда, исследованные группы больных атеросклерозом и здоровых отличаются по возрасту. Мы не могли подобрать группу доноров, соответствующую по возрасту группе больных, так как у людей старше 40 лет трудно без специальных ангиографических исследований исключить бессимптомно протекающий атеросклероз. В связи с этим можно было бы предположить, что наблюдаемые в условиях наших экспериментов различия в уровнях расщепления ЛОНП связаны с возрастными изменениями их свойств. Однако мы не выявили какой-либо связи между возрастом и интенсивностью расщепления ЛОНП липопротеидлипазой. Вместе с тем у больных с различными типами ГЛП снижение уровня расщепления выражено неодинаково. Наибольшее снижение интенсивности расщепления ЛОНП наблюдалось у больных с ГЛП типа IV и IIб, т. е. у больных с по-

вышенными концентрациями ЛОНП в сыворотке крови, меньшее снижение — у больных с нормальными концентрациями ЛОНП (без ГЛП и с ГЛП типа IIa). При этом снижение расщепления было статистически мало значимым.

Рассмотрение гистограмм частоты встречаемости лиц с определенным уровнем расщепления ЛОНП показывает, что примерно у половины обследованных больных имеют место такие уровни расщепления (см. рисунок, А — В), которые не наблюдаются у здоровых (см. рисунок, Г). Наиболее часто низкие уровни расщепления ЛОНП наблюдаются у больных с ГЛП типа IV и IIb (см. рисунок, Б и В). Низкие уровни расщепления ЛОНП реже всего встречаются у людей с нормальными концентрациями ЛОНП в сыворотке крови — больных без ГЛП и с ГЛП типа IIa (см. рисунок, А). Снижение гидролиза триглицеридов в ЛОНП может быть обусловлено изменением состава и структуры мицелл ЛОНП, изменением в этих липопротеидах количественного соотношения активаторов или ингибиторов фермента. Однако фракция ЛОНП сильно гетерогенна и однозначное решение этого вопроса встречает принципиальные трудности. Тем не менее обращает на себя внимание то, что уменьшение степени гидролиза ЛОНП наблюдается у людей с повышенной концентрацией этой фракции липопротеидов в сыворотке крови. В связи с этим можно допустить, что при увеличении концентрации ЛОНП в сыворотке крови повышение содержания отдельных компонентов ЛОНП происходит неравномерно и поэтому изменяется соотношение активаторов и ингибиторов липопротеидлипазы, входящих в состав этой фракции. Действительно, в состав ЛОНП входят компоненты, одни из которых яв-



Частота встречаемости (в %) отдельных уровней расщепления ЛОНП с  $s_f$  100—400 S липопротеидлипазой у больных атеросклерозом и доноров.

По оси абсцисс — количество жирных кислот (в мкмоль), освобождающихся за 20 мин гидролиза ЛОНП липопротеидлипазой. А — больные без ГЛП и с ГЛП типа IIa; Б — больные с ГЛП типа IIb; В — больные с ГЛП типа IV; Г — доноры. Заштрихованы гистограмма доноров и соответствующие ей участки на гистограммах больных.

ляются активаторами липопротеидлипазы, а другие — ингибиторами. В частности, Ла Роза и соавт. [17], Браун и соавт. [18], а также Хэйвел и соавт. [19] показали, что апопротеид  $C_{III}$  ЛОНП активирует, а апопротеид  $C_{II}$  ингибирует липопротеидлипазу. Высказанное предположение согласуется с данными Карлсона [20], который показал, что у людей с ГЛП типа IV и V относительное содержание апопротеида  $C_{III}$  во фракции ЛОНП больше, а относительное содержание апопротеида  $C_{II}$  меньше, чем у людей без ГЛП. При сравнении ЛОНП здоровых людей и людей с ГЛП IV и V типов было обнаружено уменьшение соотношения апо- $C_{II}$ /апо- $C_{III}$  во фракции ЛОНП с увеличением содержания фракции ЛОНП в сыворотке крови.

Выражаем глубокую благодарность проф. Е. Н. Герасимовой и проф. В. О. Шпикитеру за ценные советы и постоянное внимание к данной работе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Петрова-Маслако, ва Л. Г. и др. — Вестн. АМН СССР, 1969, № 9, с. 43. — 2. Ott H., Lohss F., Gergely J. — Klin. Wschr., 1958, Bd 36, S. 383. — 3. Smith E. B., Slaughter R. S. — Atherosclerosis, 1970, v. 11, p. 417. — 4. Hazzard W. R., Lindgren F. T., Bierman E. L. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 202, p. 517. — 5. Slack J., Mills G. L. — Clin. chim. Acta, 1970, v. 29, p. 15. — 6. Bagnall T. F. — Ibid., 1972, v. 42, p. 229. — 7. Gotto A. M., Brown W. V., Levy R. I. et al. — J. clin. Invest., 1972, v. 51, p. 1486. — 8. Sata T., Havel R. J., Jones A. L. — J. Lipid Res., 1972, v. 13, p. 757. — 9. Левитова Е. Н., Лобова Н. М., Титов В. Н. — В кн.: Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. М., 1975, с. 66. — 10. de Lalla O. F., Tandy R. K., Loeb H. G. — Clin. Chem., 1967, v. 13, p. 85. — 11. Fredrickson D. S., Levy R. I., Lees R. S. — New Engl. J. Med., 1967, v. 276, p. 34. — 12. Gustafson A., Alaupovic P., Furman R. H. — Biochemistry (Wash.), 1965, v. 4, p. 596. — 13. de Lalla O. F., Gofman J. W. — In: Methods of Biochemical Analysis, Ed. D. Glick, New York, 1954, v. 1, p. 459. — 14. Fielding C. J. — Biochim. biophys. Acta, 1969, v. 178, p. 499. — 15. Korn E. D., Quigley T. W. — J. biol. Chem., 1957, v. 226, p. 833. — 16. de Pury G. G., Collins F. D. — J. Lipid Res., 1972, v. 13, p. 268. — 17. La Rosa J. C., Levy R. I., Herbert P. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1970, v. 41, p. 57. — 18. Brown W. V., Baglinsky M. L. — Ibid., 1972, v. 46, p. 375. — 19. Havel R., Fielding Ch. J., Olivecrona Th. et al. — Biochemistry (Wash.), 1973, v. 12, p. 1828. — 20. Carlson L. A., Ballantyne D. — Atherosclerosis, 1976, v. 23, p. 563.

Поступила 1/IX 1977 г.

### CLEAVAGE OF THE FRACTION OF VERY LOW DENSITY LIPOPROTEINS, CATALYZED BY LIPOPROTEIN LIPASE, FROM BLOOD SERA OF NORMAL PEOPLE AND OF PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS

E. N. Levitova, N. M. Lobova

Institute of Biological and Medical Chemistry, A. L. Myasnikov Institute of Cardiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

In vitro experiments showed that blood sera of the patients with atherosclerosis contained rather often the fraction of very low density lipoproteins (VLDL) with  $s_f$  100-400 S, which were cleaved by the lipoprotein lipase at the decreased rate as compared with that of normal people. The decrease in cleavage of the VLDL fraction was usually observed in patients with the increased concentration of the lipoprotein fraction in blood sera. These data suggest that separate constituents occurring in the VLDL fraction ( $s_f$  100-400 S) may be nonuniformly increased in hyperlipoproteinemia.

УДК 612.172.015.1-06:612.275.1

Ф. З. Меерсон, М. Г. Пшенникова, Л. П. Голубева,  
Е. Янишевски, Э. Г. Краузе, А. Волленбергер

### ВЛИЯНИЕ АДАПТАЦИИ К ВЫСОТНОЙ ГИПОКСИИ И ХОЛОДУ НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛЦИКЛАЗЫ МИОКАРДА КРЫС

Лаборатория патофизиологии сердца Института общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва; Отдел клеточной и молекулярной кардиологии Центрального института исследования регуляции сердца и кровообращения АН ГДР, Берлин-Бух, ГДР

*Базальная активность аденилциклазы сердечной мышцы крыс, адаптированных к холоду, увеличена, а крыс, адаптированных к высотной гипоксии, не отличалась от контроля. Способность аденилциклазы активироваться норадреналином, фторидом натрия и 5-гуанилилимидодифосфатом оказалась в значительной степени сниженной у крыс, адаптированных к обоим факторам среды.*

Роль аденилциклазной системы в регуляции функций организма и, в частности, сократительной функции сердца известна [1—3]. Однако изменения активности этой системы в процессе адаптации к факторам внешней среды мало изучены. Так, активность аденилциклазной системы сердечной мышцы при адаптации к высотной гипоксии и холоду не исследована. Между тем физиологические данные об изменении адренергической регу-

ляции сердца при обоих этих состояниях [4, 5] позволяют думать, что адаптация может существенным образом влиять на аденилциклазную систему сердечной мышцы.

В настоящей работе изучали активность аденилциклазы сердечной мышцы у крыс, адаптированных к высотной гипоксии и холоду, а также влияние на эту активность норадrenalина, фторида натрия (NaF) и деривата ГФФ 5'-гуанилилимидодифосфата [ГФФ (NH)Ф]. Для этой цели использовали фракцию грубых частиц гомогената миокарда, которая содержала аденилциклазный комплекс рецептор — фермент, способный активироваться катехоламинами и другими стимуляторами.

### Методика

Работа проведена на белых беспородных крысах-самцах в возрасте 3—4 мес, разделенных на 3 группы. 1-я группа — крысы, адаптированные к высотной гипоксии в барокамере 5 раз в неделю по 6 ч в день в течение 5—6 нед на «высоте» 6000 м над уровнем моря; данная «высота» достигалась постепенно в течение первых 5 дней адаптации. 2-я группа — крысы, адаптированные к холоду в помещении с температурой около 0°C (от +3°C до -2°C) в течение 38 дней; длительность ежедневного пребывания животных в этом помещении увеличивали постепенно от 30 мин до 5 ч в течение первых 18 дней адаптации. В последующие 20 дней длительность ежедневной адаптации составляла 5 ч. 3-я группа — контрольные крысы, не подвергавшиеся действию изучаемых факторов.

Для определения активности аденилциклазы сердечной мышцы ткань желудочков сердца гомогенизировали при 0°C в течение 4 с в гомогенизаторе «Ultra-Turrax» (ФРГ) и затем с помощью ступенчатого центрифугирования получали фракцию грубых частиц миокарда [6]. В этой фракции определяли активность аденилциклазы [7]. Модифицированная инкубационная среда для определения активности фермента в конечном объеме 150 мкл имела состав: 40 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5,5 мМ КСl, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 8 мМ фосфоэнолпируват, 20 мкг пируваткиназы, 2 мМ цАМФ, 8 мМ аминофиллин, 1,5 мкг сывороточного альбумина человека, 0,4 мМ <sup>14</sup>С-АТФ (1—3 мКи/моль), фракция частиц миокарда (200—400 мкг белка). Реакцию вели 15 мин при 30°C и прекращали 3-минутным нагреванием. Образующийся <sup>14</sup>С-цАМФ определяли по методу Кришна и соавт. [8]; для оценки выхода использовали <sup>3</sup>Н-цАМФ. Радиоактивность регистрировали с помощью сцинтилляторного счетчика фирмы LKB (Швеция). Белок определяли по методу Лоури и соавт. [9]. Используемые вещества: норадrenalин гидрохлорид (фирма «Schuchardt», ФРГ); пируваткиназа, цАМФ, фосфоэнолпируват и ГФФ (NH)Ф (фирма «Boehringer, Mannheim», ФРГ); <sup>3</sup>Н-цАМФ и <sup>14</sup>С-АТФ (фирма «Amersham», Англия).

### Результаты исследования

В таблице представлены данные об исходной активности аденилциклазы миокарда и ее изменениях при действии эффективных стимуляторов в дозах, вызывающих максимальную активацию фермента. Из таблицы следует, что базальная активность аденилциклазы миокарда при адаптации к холоду существенно увеличена по сравнению с контролем, а при адаптации к высотной гипоксии, напротив, имеет тенденцию к снижению. При действии высокой концентрации (10<sup>-4</sup> М) норадrenalина прирост активности фермента в абсолютных величинах (в пикомолях цАМФ) при адаптации к холоду уменьшен примерно на одну треть, а при адаптации к гипоксии — в 2 раза по сравнению с контролем.

В результате максимально достижимый уровень активности фермента при действии высокой концентрации норадrenalина оказывается при адаптации к холоду увеличенным, а при адаптации к гипоксии — уменьшенным по сравнению с контролем. При действии других эффективных стимуляторов — фторида натрия и ГФФ (NH)Ф — прирост активности аденилциклазы у адаптированных к холоду животных существенно не отличается от контроля, однако вследствие высокой базальной активности фермента максимально достижимый уровень его активности в этом случае, как и при действии норадrenalина, существенно выше, чем в контроле (см. таблицу).

У животных, адаптированных к гипоксии, прирост активности аденилциклазы миокарда в ответ на действие NaF и ГФФ (NH)Ф оказался умень-

Активность аденилциклазы в миокарде контрольных крыс и крыс, адаптированных к холоду и гипоксии (среднее из 5—7 опытов)

Вариант	Активность аденилциклазы, пикомоль цАФМ/мин·мг белка					
	нордреналин, $10^{-4}$ М		NaF, 8 мМ		ГФФ (NH) Ф, $10^{-6}$ М	
	базальная ( $V_0$ )	абсолютная величина	абсолютная величина	абсолютная величина прироста от $V_0$ ( $\Delta$ )	абсолютная величина	абсолютная величина прироста от $V_0$ ( $\Delta$ )
Контроль	$31,6 \pm 3,2$	$48,9 \pm 2,2$	$78,8 \pm 7,1$	$18 \pm 1,84$ (55%)	$49,8 \pm 11,06$ (155%)	$37,92 \pm 10,1$ (120%)
Адаптация к холоду	$55,5 \pm 3,7$	$67,7 \pm 6,1$	$93,7 \pm 4,1$	$12,5 \pm 3,3$ (42%)	$38,3 \pm 8,3$ (69%)	$45,7 \pm 10,3$ (82,5%)
Адаптация к гипоксии	$24,6 \pm 2,4$	$32,0 \pm 2,6$	$41,05 \pm 2,1$	$7,38 \pm 2,5$ (30%)	$16,5 \pm 1,84$ (67%)	$16,48 \pm 3,07$ (57%)

шенным примерно в 3 и  $2\frac{1}{2}$  раза соответственно, и в результате максимально достижимый уровень активности фермента был снижен примерно в  $1\frac{1}{2}$ —2 раза по сравнению с контролем (см. таблицу).

На рисунке представлена зависимость стимулирования аденилциклазной активности миокарда нордреналином от концентрации этого медиатора. Видно, что полумаксимальная активация фермента для контрольных животных достигается при концентрации  $1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-7}$  М. Для фермента из миокарда крыс, адаптированных к высотной гипоксии, эта величина достигается при концентрации нордреналина  $9,7 \cdot 10^{-7}$  М и для фермента из миокарда крыс, адаптированных к холоду, — при концентрации  $4 \cdot 10^{-6}$  М, т. е. при концентрации нордреналина, примерно в 30 раз большей, чем концентрация, необходимая для такой же активации фермента в контроле.

Таким образом, при обоих изучаемых вариантах адаптации активируемость аденилциклазы миокарда в определенной степени снижена по сравнению с контролем. Однако при адаптации к холоду это явление реализуется в условиях повышенной базальной активности фермента, поэтому сочетается с увеличением уровня его максимальной активности при действии естественного стимулятора нордреналина. При адаптации к гипоксии снижение активируемости аденилциклазы миокарда происходит на фоне субнормальной или нормальной базальной активности и поэтому сочетается со значительным снижением уровня максимальной активности фермента при действии нордреналина.

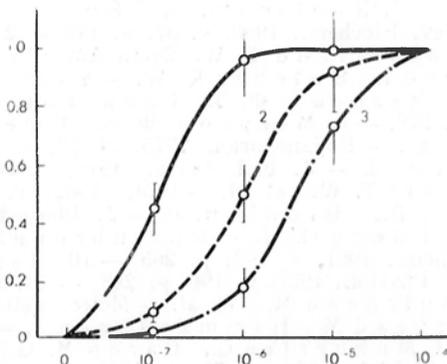
### Обсуждение результатов

При действии холода и увеличенном высвобождении нордреналина из окончаний симпатических нервов возникает адаптационная реакция, приводящая к росту интенсивности метаболизма и направленная на поддержание нормальной температуры тела [10, 11]. Показано, что в механизме этого увеличения теплопродукции наряду с повышенным выделением катехоламинов определенную роль может играть увеличение активности аденилциклазы в тканях. Ис-

следование синтеза цАМФ в жировой ткани и скелетных мышцах при адаптации к холоду показало, что в начальной стадии адаптации способность аденилциклазы из скелетной мышцы активироваться катехоламинами и NaF повышена при неизменной величине базаль-

Зависимость активации аденилциклазы миокарда норадреналином от концентрации медиатора.

По оси ординат — активность аденилциклазы в относительных величинах; по оси абсцисс — молярная концентрация норадреналина. При вычислении активности максимальную активность при стимуляции норадреналином ( $V_{max}$ ) принимали за 1; из величин активности фермента, полученных при действии возрастающих концентраций норадреналина, вычитали величину базальной активности ( $V_0$ , см. таблицу). Каждая точка — среднее из 6 опытов. Вертикальные черточки — квадратичная ошибка среднего. Зависимость активности фермента от концентрации лиганда вычисляли в соответствии с отношением Михаэлиса — Ментен. 1 — контроль, 2 — адаптация к гипоксии, 3 — адаптация к холоду.



ной активности; при более длительном действии холода эта способность нормализуется [11, 12]. Наши данные свидетельствуют, что в сердечной мышце при сформировавшейся адаптации к холоду наблюдаются выраженное увеличение базальной активности аденилциклазы, некоторое снижение ее активируемости норадреналином и значительное увеличение максимально достижимого уровня активности фермента при действии высоких концентраций этого медиатора. Очевидно, что сердце не играет существенной роли непосредственно в процессе генерации тепла, и роль этого органа в адаптации к холоду определяется тем, что он обеспечивает своевременное возрастание минутного объема, необходимое для доставки к тканям увеличенного количества кислорода. В связи с этим можно думать, что высокий уровень базальной активности аденилциклазы миокарда играет роль в той стационарной мобилизации сократительной функции сердца, которая является компонентом адаптации к холоду.

В настоящее время трудно решить, что лежит в основе наблюдаемого нами снижения способности аденилциклазы миокарда адаптированных к гипоксии животных стимулироваться норадреналином — уменьшение интенсивности связывания этого медиатора  $\beta$ -адренорецепторами или снижение чувствительности к катехоламинам самой системы рецептор — фермент [13]. При оценке полученных данных следует иметь в виду, что у животных в исследуемой стадии адаптации к гипоксии, как показали результаты проведенных ранее физиологических исследований, имеет место увеличенное влияние на сердце адренергического звена регуляции. Это проявляется в виде увеличения основных параметров сократительной функции сердца по сравнению с контрольным уровнем и снимается блокатором  $\beta$ -адренорецепторов пропранололом [14]. В условиях такого повышенного симпатико-адреналового влияния на сердце выход катехоламинов в кровь и поступление в миокард из нервных окончаний увеличены. Эти данные дают возможность полагать, что значительная часть адренорецепторов миокарда занята эндогенным медиатором и не реагирует с добавляемым экзогенным медиатором. Известно, что после инкубации эритроцитов в присутствии больших концентраций изопротеренола выделенная из них аденилциклаза обладает сниженной чувствительностью к подобным симпатомиметикам [13]. Авторы объясняют это уменьшением количества свободных пунктов связывания на адренорецепторах. Однако неясно, может ли реализоваться аналогичная ситуация при адаптации. Для выяснения механизма обнаруженного нами снижения ответа аденилциклазного комплекса на норадреналин, NaF и ГФФ (NH)F в условиях *in vitro* необходимы изучение действия катехоламинов на содержание и синтез цАМФ в интактном сердце адаптиро-

ванных животных, а также определение стабильности комплекса рецептор — фермент. Такого рода исследования выполняются нами в настоящее время.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. — Ann. Rev. Biochem., 1968, v. 37, p. 149. — 2. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. Cyclic AMP. New York, 1971. — 3. Sutherland E. W., Oye I., Butcher R. W. — Recent Progr. Hormone Res., 1965, v. 21, p. 623. — 4. Меерсон Ф. З., Гомазков О. А. — Ж. эволюц. биохимии, 1970, № 3, с. 276. — 5. Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г., Канелько В. И. и др. — Кардиология, 1975, № 12, с. 50. — 6. Drummond G. I., Duncan L. — J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 976. — 7. Murad F., Chi J. M., Rall T. W. et al. — Ibid., 1962, v. 237, p. 1233. — 8. Krishna G., Weiss B., Brodie B. B. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1968, v. 163, p. 375. — 9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265. — 10. Hsieh A. C. L., Carlson L. D. — Am. J. Physiol., 1957, v. 190, p. 243. — 11. Himmels-Hagen J., Beherens W., Muirhead M. et al. — Molec. Cell. Biochem., 1975, v. 6, p. 15. — 12. Muirhead M., Himmels-Hagen J. — Canad. J. Biochem., 1974, v. 52, p. 176. — 13. Mukherjee S., Caron M. G., Lefkowitz R. J. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 1945. — 14. Пшенникова М. Г., Новикова Н. А. — Физиол. ж. СССР, 1977, т. 63, № 8, с. 1159.

Поступила 1/IX 1977 г.

#### EFFECT OF ADAPTATION TO HIGH ALTITUDE HYPOXIA AND COOLING ON ACTIVITY OF ADENYLATE CYCLASE FROM RAT MYOCARDIUM

F. Z. Meerson, M. G. Pshennikova, L. Yu. Golubeva, E. Yanishevsky, E. G. Krause, A. Vollenberger

Laboratory of Heart Pathophysiology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, Department of Cellular and Molecular Cardiology, Central Institute for Investigation of the Heart and Circulation Regulation, Academy of Sciences of the GDR, Berlin-Buch

Activity of adenylate cyclase from heart muscle was increased in rats adapted to cooling as compared to control animals; the enzymatic activity did not alter in rats adapted to high altitude hypoxia. Activation of adenylate cyclase by noradrenaline, sodium fluoride and by 5'-guanilyl imidodiphosphate was significantly decreased in rats adapted to both environmental changes.

УДК 616.981.553-092.9-07:616-008.954.52-074

Н. П. Чеснокова

#### К ВОПРОСУ О ВЗАИМОСВЯЗИ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С МЕТАБОЛИЗМОМ КАТЕХОЛАМИНОВ ПРИ БОТУЛИНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Кафедра патологической физиологии Саратовского медицинского института

*В опытах на депанкреатизированных кошках показано, что обратимое торможение активности холинергических процессов сопровождается снижением экскреции с мочой адреналина, усилением выброса ванилилминдальной кислоты, истощением запасов катехоламинов в надпочечниках, возрастанием содержания норадреналина в ряде органов и тканей.*

*Сходные изменения возникали на паралитической стадии ботулинической интоксикации. Развитие у предварительно депанкреатизированных животных ботулинической или столбнячной нейротоксикации, сопровождающихся необратимым торможением освобождения ацетилхолина в мионевральных синапсах, резко усугубляло нарушения метаболизма катехоламинов. Последнее проявлялось снижением общего уровня исследуемых соединений в различных органах и тканях.*

Как установлено ранее, при ботулинической интоксикации у кошек возникают выраженные нарушения обмена катехоламинов, характеризующиеся усилением экскреции адреналина, ванилилминдальной кислоты, снижением выброса норадреналина с мочой, мобилизацией катехоламинов из надпочечников, фазными изменениями соотношения адреналина и норадрена-

лина в различных органах и тканях в соответствии с тяжестью клинических проявлений интоксикации [1].

Известно, что ботулинический токсин является классическим блокаторм освобождения ацетилхолина в мионевральных соматических и вегетативных холинергических синапсах [2—4].

В связи с этим для выяснения механизмов развития вегетативной дистонии при ботулизме необходимо было уточнить, не связаны ли обнаруженные изменения обмена катехоламинов при экспериментальной ботулинической интоксикации со специфической блокадой освобождения ацетилхолина под влиянием ботулинического токсина.

Для частичного решения этого вопроса были поставлены опыты по изучению влияния обратимого торможения холинергических процессов у депанкреатизированных животных на метаболизм биогенных аминов. Было также выяснено влияние предварительного торможения синтеза ацетилхолина у депанкреатизированных животных на обмен катехоламинов при последующем развитии прогрессирующих форм столбнячной и ботулинической пейроинтоксикаций, вызывающих необратимое торможение освобождения ацетилхолина в мионевральных синапсах [3—5]. Литературные данные свидетельствуют о том, что максимальные нарушения синтеза ацетилхолина и снижения активности холинергических структур наблюдаются обычно спустя 6—7 сут после депанкреатизации по А. В. Кибякову [6—7].

### М е т о д и к а

Опыты поставлены на кошках массой 3—4 кг. Проведено несколько серий исследований на здоровых кошках, депанкреатизированных животных, а также на кошках, предварительно депанкреатизированных и затравленных ботулиническим или столбнячным токсином.

Опыты на депанкреатизированных кошках поставлены на 7—8-е сутки после операции в период максимального дефицита ацетилхолина и торможения холинергических процессов в организме. Опыты на затравленных животных поставлены через 1½—2 сут после внутривенного введения ботулинического токсина типа С в дозе 2,5 мг/кг на фоне паралитического синдрома, а также через 2—3 сут после введения столбнячного токсина в той же дозировке на фоне клиники тяжелого генерализованного столбняка.

Ряд экспериментов проведен на кошках, затравка которых производилась ботулиническим или столбнячным токсином на 6—7-е сутки после депанкреатизации. Во всех модификациях экспериментов изучали экскрецию с мочой ванилилминдальной кислоты, адреналина, норадrenalина, а также содержание катехоламинов в различных органах и тканях (надпочечниках, гипоталамусе, двигательной зоне коры головного мозга, мозжечке, спинном мозге, мышце, сердце, печени, почках). Содержание катехоламинов определяли общепринятым триоксииндоловым методом в модификации В. В. Меньшикова [8]. Для исследования экскреции ванилилминдальной кислоты использован метод низковольтного электрофореза с последующим проявлением диазотированным парапнтроанилином и спектрофотометрией [9].

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

Как показали результаты исследований (табл. 1), обратимое нарушение синтеза ацетилхолина у депанкреатизированных животных сочеталось с выраженными нарушениями экскреции катехоламинов и их метаболитов — снижением экскреции адреналина и усилением выброса ванилилминдальной кислоты с мочой. Изменений со стороны экскреции норадrenalина обнаружить не удалось. После однократного введения компенсаторной дозы ацетилхолина (0,5 мл на 3 кг массы в разведении 1 : 1000) депанкреатизированным кошкам мы не обнаружили изменений в выделении адреналина и норадrenalина в течение последующих суток, в то время как экскреция ванилилминдальной кислоты снижалась.

Усиление экскреции ванилилминдальной кислоты — основного продукта метилирования и окислительного дезаминирования катехоламинов — свидетельствовало об активации процессов распада их в тканях в период максимального нарушения активности холинергических процессов. В свя-

зи с этим целесообразно было выяснить, как отражается депанкреатизация на балансе тканевых катехоламинов. Как оказалось (табл. 2), в исследуемый период у депанкреатизированных животных имело место истощение запасов катехоламинов в надпочечниках, возрастание содержания норадреналина в гипоталамусе, спинном мозге, седалищных нервах. В то же время в коре головного мозга, мозжечке, икроножных мышцах, сердце, печени, почках выявить сколько-нибудь выраженных изменений содержания адреналина и норадреналина не удалось. Однократное введение ацетилхолина не отражалось на содержании катехоламинов во многих тканях депанкреатизированных животных в течение первых суток после внутривенного введения препарата.

Далее представляло интерес сопоставить обнаруженные изменения обмена катехоламинов у депанкреатизированных животных, характеризующихся обратимым торможением холинергических процессов, с теми нару-

Т а б л и ц а 1

Содержание катехоламинов и ванилилминдальной кислоты в суточной моче депанкреатизированных кошек

Серия опытов	Адреналин, мкг/сутки	<i>P</i>	Норадреналин, мкг/сутки	<i>P</i>	Ванилилминдальная кислота, мг/сутки	<i>P</i>
Контроль (10)	0,97±0,09	—	1,90±0,1	—	0,33±0,04	—
Депанкреатизация (10)	0,68±0,08	<0,05	1,84±0,29	>0,5	0,48±0,03	<0,01
Депанкреатизация -/+ ацетилхолина (10)	0,67±0,08	<0,05	1,66±0,19	>0,5	0,24±0,033	<0,05

П р и м е ч а н и е. *C* — рассчитано по отношению к контролю. В скобках — число животных. Здесь и в табл. 2—4.

шениями, которые возникают на паралитической стадии ботулинической интоксикации в условиях «необратимого» торможения холинергических процессов.

Как обнаружено ранее [1], паралитическая стадия интоксикации сопровождалась снижением экскреции норадреналина и усилением экскреции ванилилминдальной кислоты с мочой. Что касается содержания катехоламинов в тканях на поздней стадии интоксикации (табл. 3), то оно характеризовалось преобладанием норадреналина над адреналином за счет резкого возрастания уровня норадреналина (в гипоталамусе, мозжечке, сердце) или снижения содержания адреналина (в коре, спинном мозге, печени, почках).

Таким образом, изменения обмена катехоламинов возникали в обеих модификациях эксперимента — в случае обратимого и необратимого торможения активности холинергических процессов. Естественно, нельзя было ожидать полной идентичности обнаруженных нарушений обмена катехоламинов. В случае ботулинической интоксикации возникала более выраженная, нежели у депанкреатизированных животных, блокада холинергических процессов, приводившая к развитию асфиксического синдрома. Однако, как установлено ранее, гипоксическому фактору не может быть отведена ведущая роль в генезе обнаруженных изменений метаболизма катехоламинов при ботулинической интоксикации.

Представляло интерес выяснить, как отразится предварительная депанкреатизация на содержании катехоламинов в тканях кошек при последующем развитии у них ботулинической интоксикации (табл. 4). В этой модификации экспериментов возникали сходные с предыдущей серией, но еще более выраженные нарушения обмена катехоламинов: содержание адреналина в большинстве исследуемых органов и тканей было значительно

Т а б л и ц а 2

## Содержание катехоламинов в органах и тканях кошек на фоне депанкреатизации

Орган, ткань	Депанкреатизация			P	Депанкреатизация + ацетилхолин					
	адреналин, мкг/г	P	норадреналин, мкг/г		адреналин, мкг/г	P	P <sub>1</sub>	норадреналин, мкг/г	P	P <sub>1</sub>
Гипоталамус	0,09±0,009	> 0,5	0,50±0,080	< 0,001	0,28±0,021	< 0,001	< 0,001	0,37±0,050	< 0,001	> 0,1
Кора	0,08±0,020	> 0,5	0,15±0,031	> 0,1	0,11±0,015	< 0,01	> 0,1	0,31±0,024	< 0,001	< 0,001
Мозжечок	0,09±0,017	> 0,5	0,20±0,014	> 0,5	0,11±0,015	> 0,05	> 0,1	0,30±0,031	< 0,02	> 0,05
Спинальный мозг	0,07±0,011	> 0,5	0,30±0,066	< 0,001	0,24±0,013	< 0,001	< 0,001	0,61±0,060	< 0,001	< 0,001
Икрожные мышцы	0,06±0,012	> 0,1	0,19±0,035	> 0,5	0,11±0,014	> 0,1	< 0,05	0,26±0,031	> 0,05	> 0,1
Сердце	0,10±0,015	> 0,1	0,21±0,014	> 0,5	0,14±0,016	< 0,01	> 0,05	0,26±0,019	< 0,05	> 0,1
Печень	0,09±0,012	> 0,5	0,22±0,05	> 0,5	0,12±0,007	> 0,5	< 0,5	0,23±0,032	> 0,1	> 0,5
Почки	0,07±0,001	> 0,5	0,27±0,040	> 0,1	0,11±0,016	> 0,5	> 0,1	0,30±0,030	> 0,5	> 0,5
Надпочечники	92,8±7,9	< 0,001	26,9±2,4	< 0,001	108,2±10,2	< 0,001	> 0,5	26,6±2,40	< 0,001	> 0,5

Примечание. P рассчитано по отношению к контролю (см. табл. 3); P<sub>1</sub> — к группе депанкреатизированных животных. В каждой группе обследовано по 10 животных.

Т а б л и ц а 3

## Содержание катехоламинов в органах и тканях кошек на поздней стадии столбнячной и ботулинической интоксикации

Орган, ткань	Контроль		Столбнячная интоксикация				Ботулиническая интоксикация			
	адреналин, мкг/г	норадреналин, мкг/г	адреналин, мкг/г	P	норадреналин, мкг/г	P	адреналин, мкг/г	P	норадреналин, мкг/г	P
Кора	0,06±0,006	0,21±0,013	0,22±0,013	< 0,001	0,14±0,013	< 0,01	0,03±0,004	< 0,001	0,15±0,019	< 0,01
Гипоталамус	0,09±0,007	0,17±0,010	0,20±0,08	< 0,001	0,24±0,031	> 0,05	0,11±0,006	> 0,05	0,52±0,091	< 0,001
Мозжечок	0,08±0,008	0,21±0,011	0,15±0,009	< 0,001	0,08±0,01	< 0,001	0,07±0,001	> 0,1	0,31±0,030	< 0,02
Спинальный мозг	0,07±0,005	0,24±0,012	0,24±0,05	< 0,01	0,16±0,015	< 0,01	0,04±0,007	< 0,01	0,17±0,006	> 0,1
Икрожная мышца	0,09±0,009	0,20±0,01	0,13±0,015	> 0,2	0,08±0,003	< 0,001	0,07±0,009	> 0,05	0,26±0,03	> 0,05
Сердце	0,09±0,008	0,21±0,009	0,14±0,008	< 0,02	0,11±0,013	< 0,001	0,09±0,012	> 0,2	0,32±0,035	< 0,01
Печень	0,09±0,006	0,22±0,013	0,15±0,013	< 0,01	0,09±0,015	< 0,001	0,06±0,008	< 0,01	0,22±0,035	> 0,2
Почки	0,08±0,006	0,32±0,017	0,04±0,008	< 0,05	0,06±0,005	< 0,001	0,04±0,008	< 0,01	0,36±0,05	> 0,2
Надпочечники	2,66±8,9	55,9±3,5	41,2±3,6	< 0,001	26,5±3,4	< 0,001	20,8±3,2	< 0,001	13,9±1,2	< 0,001

Примечание. P рассчитано по отношению к контролю. В каждой группе обследовано по 9—14 животных.

Влияние депанкреатизации на содержание катехоламинов в органах кошек на поздней стадии столбнячной и ботулинической интоксикации

Орган, ткань	Ботулиническая интоксикация				Столбнячная интоксикация							
	адреналин, мкг/г	P	P <sub>1</sub>	норадреналин, мкг/г	P	P <sub>1</sub>	адреналин, мкг/г	P	P <sub>1</sub>	норадреналин, мкг/г	P	P <sub>1</sub>
Гипоталамус	0,05±0,009	<0,01	<0,001	0,30±0,041	<0,02	<0,05	0,09±0,01	>0,5	<0,001	0,1±0,01	<0,001	<0,001
Кора	0,04±0,008	>0,05	>0,1	0,12±0,02	>0,1	>0,1	0,07±0,01	>0,1	<0,001	0,07±0,01	<0,001	<0,001
Мозжечок	0,04±0,009	<0,01	<0,05	0,13±0,02	<0,05	<0,001	0,07±0,01	>0,1	<0,001	0,07±0,01	<0,001	<0,001
Спинальный мозг	0,11±0,002	>0,5	<0,05	0,16±0,03	<0,05	>0,5	0,06±0,01	>0,1	<0,001	0,13±0,02	<0,001	<0,001
Икроножная мышца	0,04±0,009	<0,001	<0,05	0,09±0,018	<0,001	<0,001	0,07±0,01	>0,05	<0,001	0,06±0,01	<0,001	<0,05
Сердце	0,05±0,001	<0,001	>0,05	0,10±0,02	<0,001	<0,001	0,04±0,001	<0,001	<0,001	0,08±0,01	<0,001	<0,05
Печень	0,04±0,009	<0,001	>0,05	0,09±0,015	<0,001	<0,01	0,06±0,01	<0,02	<0,001	0,07±0,01	<0,001	<0,05
Почки	0,05±0,001	<0,01	>0,5	0,13±0,03	<0,001	<0,02	0,06±0,01	>0,05	>0,05	0,08±0,01	>0,05	>0,05
Надпочечники	55,5±4,6	<0,001	<0,001	20,4±2,8	<0,001	<0,001	12,4±0,92	<0,001	<0,001	21,8±2,1	<0,001	<0,05

Примечание. P — рассчитано по отношению к контролю. P<sub>1</sub> — к соответствующей стадии интоксикации без депанкреатизации. В каждой группе обследовано по 10 животных.

ниже контроля. В гипоталамусе, мозжечке, икроножных мышцах, сердце уровень адреналина снижался и по сравнению с группой неоперированных затравленных животных. Одновременно отмечался низкий уровень норадреналина в различных органах и тканях.

Таким образом, использование двух моделей эксперимента — обратимого торможения синтеза ацетилхолина у депанкреатизированных животных и последующее развитие у них ботулинической интоксикации, сопровождающейся необратимым торможением холинергических процессов, резко усугубляло изменение метаболизма катехоламинов. Последнее свидетельствует о тесной взаимосвязи обмена катехоламинов и активности холинергических процессов. В связи с этим не исключено, что первичная пре-синаптическая блокада освобождения ацетилхолина в преганглионарных холинергических симпатических структурах, вызываемая ботулиническим токсином, влечет за собой и определенные нарушения обмена катехоламинов, закономерно сопутствующие интоксикации.

Аналогичный вывод о чрезвычайной роли активности холинергических процессов в обмене тканевых катехоламинов был сделан в модификациях опытов с воспроизведением столбнячной интоксикации на предварительно депанкреатизированных животных.

Как указано в литературных данных [5], при столбнячной интоксикации возникает блок выброса передатчика в соматических холинергических синапсах по аналогии с ботулинической интоксикацией.

Развитие столбнячной интоксикации на фоне обратимого торможения активности холинергических процессов сопровождалось такими же рельефными изменениями баланса катехоламинов в тканях, как и в моди-

фикациях опытов с ботулинической интоксикацией у депанкреатизированных животных: уровень адреналина снижался практически во всех тканях по сравнению с группой неоперированных затравленных животных. При этом содержание норадrenalина оставалось значительно ниже нормы в большинстве исследуемых структур.

Таким образом, во всех модификациях опытов было отмечено, что большее или меньшее торможение активности холинергических процессов сопровождается изменением обмена катехоламинов в тканях, что проявляется снижением общего содержания исследуемых соединений в связи с активацией их обмена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Чеснокова Н. П. — В кн.: Патофизиология инфекционного процесса и аллергии. Саратов, 1973, с. 158. — 2. Tord a C., Wolf H. G. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1947, v. 89, p. 320. — 3. Ambache N. — J. Physiol. (Lond.), 1949, v. 108, p. 127. — 4. Brooks V. B. — Ibid., 1954, v. 123, p. 501. — 5. Крыжановский Г. П., Поздняков О. М., Полгар А. А. Патология синаптического аппарата мышцы. М., 1974. — 6. Кибяков А. В., Узбеков А. А. — Бюлл. exper. биол., 1950, № 3, с. 202. — 7. Зефирова Л. Н., Кибяков А. В. — Физиол. ж. СССР, 1954, № 2, с. 183. — 8. Меньшиков В. В. — Лабор. дело, 1961, № 4, с. 18. — 9. Меньшиков В. В., Большакова Т. Д. — Кардиология, 1963, № 5, с. 91.

Поступила 28/IV 1977 г.

#### ON THE RELATION BETWEEN ACTIVITY OF CHOLINERGIC PROCESSES AND CATECHOLAMINE METABOLISM IN BOTULINIC INTOXICATION

*N. P. Chesnokova*

Chair of Pathophysiology, Medical School, Saratov

Reversible inhibition of cholinergic processes in cats after pancreatectomy was accompanied by decreased urinary excretion of adrenaline, increased excretion of vanilyl mandelic acid, exhaustion of catecholamine stores in adrenal glands and increased content of noradrenaline in some tissues. Similar alterations occurred in the paralytic step of botulinic intoxication. Metabolism of catecholamines was much more distinctly impaired in previously pancreatectomized animals after development of botulinic and tetanic neurointoxications, which were accompanied by irreversible inhibition of acetylcholine liberation in myoneural synapses. Impairments of catecholamine metabolism were manifested in a decrease in total content of the substances studied in various tissues.

УДК 616.36-006.6-092-07:616.36-008.931-074

*В. К. Гуркало, А. В. Третьяков*

#### ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ, АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ И АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССЕ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗА

Научно-исследовательский институт онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Министерства здравоохранения СССР, Ленинград

*В процессе гепатоканцерогенеза, вызванного введением крысам 2-ацетиламинофлуорена и диэтилнитрозамина, исследовалось изменение активности маркерных ферментов митохондрий клеток печени. Биохимические параметры сопоставлялись с морфологическими изменениями в соответствии с четырьмя стадиями канцерогенеза. Установлены фазные, зависящие от стадии канцерогенеза, изменения активности моноаминоксидазы, аденилатциклазы и аденозинтрифосфатазы митохондрий. Активность аденилатциклазы цитоплазматических мембран в ходе гепатоканцерогенеза прогрессивно снижалась. Изменения активности ферментов, возникающие на стадии стимуляции пролиферации клеточных элементов печени, сохранялись на дальнейших этапах канцерогенеза. Высказывается предположение, что обнаруженные изменения активности ферментов митохондрий отражают изменения регуляции клеточного гомеостаза в соответствии с новым типом метаболических процессов, свойственных трансформированным клеткам.*

Известно, что многие митохондриальные ферменты клеток печени в процессе гепатоканцерогенеза изменяют свою активность [1]. В основе этого

явления лежат два основных механизма: прямое повреждающее действие химических канцерогенов и изменение репродукции митохондрий под их влиянием.

Однако разнонаправленные изменения свойств различных митохондриальных ферментов и их неспособность восстанавливать свою активность после прекращения действия канцерогена не позволяют считать основным в этом механизме ингибирующее действие химических канцерогенов.

Отсутствие корреляции между изменением активности маркерных ферментов матрикса и митохондриальных мембран в процессе канцерогенеза также не позволяет объяснить эти изменения подавлением репродукции митохондрий.

На наш взгляд, самым существенным недостатком практически всех работ в вышеуказанном направлении является «механическая» привязка биохимических изменений, выявляемых в процессе химического канцерогенеза, к срокам введения канцерогена. Более правомочным, по нашему мнению, является сопоставление биохимических нарушений с морфологическими изменениями применительно к каждому подопытному животному. Подобный морфофункциональный подход позволил бы ближе подойти к выяснению биохимических механизмов бластомогенной трансформации.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение изменения метаболической активности митохондриальных мембран клеток печени крыс в процессе гепатоканцерогенеза на основании сопоставления биохимических изменений с определенным этапом бластомогенной трансформации.

В качестве гепатотропных канцерогенов были выбраны 2-ацетиламинофлуорен (ААФ) и диэтилнитрозамин (ДЭНА).

Об изменении свойств митохондриальных мембран в процессе гепатоканцерогенеза судили по активности моноаминоксидазы (МАО, КФ 1. 4. 3. 4), аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы, КФ 3. 6. 1. 3) и аденилатциклазы (АЦ-азы, КФ-4. 6. 1. 1). Выбор именно этих ферментов объясняется не только тем, что МАО и АЦ-аза — маркерные ферменты наружных мембран, а АТФ-аза — маркерный фермент внутренней мембраны, но и чрезвычайно важной ролью этих белков в жизнедеятельности клеток.

#### М е т о д и к а

Опыты выполнены на 100 белых беспородных крысах-самцах. Митохондрии выделяли в 0,25 М сахарозе — 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 7,4, как описано ранее [2]. Условия определения активности МАО и АТ-азы описаны в наших работах [3, 4]. Для определения активности АЦ-азы митохондрии выделяли в смеси, содержащей  $2 \cdot 10^{-3}$  М  $MgSO_4$ ,  $2 \cdot 10^{-3}$  М NaCl,  $2 \cdot 10^{-3}$  М глицил-глициновый буфер, в интервале ускорений 800—6000 g. Материал, осажденный при 800 g, многократно промывали тем же буфером и использовали как препарат плазматических мембран. При фазово-контрастной микроскопии осадка цельных клеток и ядер не обнаруживали. Активность аденозинмонофосфатазы (КФ 3.1.3.2) при рН 7,5 в препаратах плазматических мембран составляла в среднем 0,08 мкмоль  $P_H$ /мг/60 мин (против 0,005 мкмоль во фракции микросом), активность глюкозо-6-фосфатазы (КФ 3.1.3.9) — 0,02 мкмоль  $P_H$ /мг/60 мин (против 0,14 мкмоль  $P_H$ /мг/60 мин во фракции микросом), активность АТФ-азы — 0,02 мкмоль  $P_H$ /мг/15 мин (против 0,14 мкмоль во фракции митохондрий). Активность АЦ-азы определяли по модифицированному методу [5]. Инкубационная среда в объеме 0,42 мл содержала 1 мкмоль АТФ, 0,005 мкмоль  $H^3$ -АТФ (отечественного производства, уд. радиоактивность 4,6 мКи/мл), 3,6 мкмоль  $MgSO_4$ , 100 мкмоль кофеина, 6 мкмоль NaF, 120 мкмоль глицил-глицина, 200—400 мкг белка. Реакцию проводили при 25°C в течение 60 мин и останавливали нагреванием проб на кипящей водяной бане в течение 40 с. Затем пробы центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин и 10 мкл надосадочной жидкости наносили на пластинки с ДЭАЭ-целлюлозой. В точки нанесения вносили около 30 мкг АМФ («Сигма») в объеме 10 мкл и хроматографировали в системе изопропанол—аммиак — вода (7,5 : 1,5 : 1,5) [6]. После высушивания пластинки зоны локализации цАМФ устанавливали визуально на ультрафиолетовом, отделяли и вносили во флаконы с сцинтиллятором для исследования на счетчике «Magk II». Активность фермента выражали в импульсах на 1 мг за 60 мин инкубации. Пластинки с ДЭАЭ-целлюлозой готовили следующим образом. Обработанную по общим правилам и уравновешенную 0,005 М трис-НСI-буфером, рН 7,4 ДЭАЭ-целлюлозу наносили из суспензии (буфер ДЭАЭ-целлюлоза, 1 : 1 по объе-

му) в количестве 27 мл на стеклянную пластинку размером 9×12 см и высушивали при комнатной температуре. Препарат  $H^3$ -АТФ, используемый в опытах, содержал по результатам хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (растворитель 0,04 и. НС1) АМФ, АДФ и АТФ по 30% соответственно. Препарат АТФ («Сигма») содержал практически 95% основного вещества. R<sub>f</sub> для цАМФ составлял 0,42, а для АМФ, АДФ и АТФ при хроматографии в системе изопропанол — аммиак — вода — 0,04—0,06.

Опухоли печени у крыс вызывали введением ААФ и ДЭНА. ААФ, суспендированный в геле агар-агара, вводили животным зондом по 4 мг на животное в течение 6 мес. Кроме общего свойства — гепатотропности, выбранные канцерогены в использованных дозах обладали способностью вызывать малигнизацию различных клеточных элементов печени. Так, ААФ вызывал преимущественную бластомогенную трансформацию холангиолярного эпителия, а ДЭНА — гепатоцеллюлярного. Печень подопытных животных, забитых на различных этапах канцерогенеза, исследовали микроскопически с целью установления гистологического диагноза. Изменения активности исследованных ферментов соответствовали стадиям канцерогенеза (включая и токсическую фазу), выявляемым по критерию максимальной выраженности морфологического процесса бластомогенной трансформации. Токсическая фаза характеризуется функциональными изменениями и определяется, на наш взгляд, фармакологическими эффектами химических канцерогенов и модификацией ими внутри- и внеклеточных регуляторных влияний. Первая стадия канцерогенеза характеризовалась структурными перестройками ткани печени — стимуляцией пролиферации эмбриональных предшественников желчных клеток (в случае ААФ) и атипичных гепатоцитов (в случае ДЭНА). Определяющим для второй стадии канцерогенеза являлось формирование доброкачественных опухолей, а для третьей — выявляемые гистологически холангио- или гепатоцеллюлярные раки.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 и 2 приведены результаты исследования активности МАО и АТФ-азы митохондрий клеток печени в процессе гепатоканцерогенеза, вызванного ААФ. Можно видеть, что в токсической фазе АТФ-азная актив-

ность значительно повышена, тогда как каталитическая активность МАО не изменяется. Является хорошо установленным фактом, что в течение первых недель введения животным канцерогенных аминокислотных соединений и ароматических аминов из гепатоцитов исчезают запасы гликогена [7]. Вероятно, вследствие стимуляции окисления глюкозы в цикле Кребса и появляется высокая активность АТФ-азы,носящая, таким образом, функциональный характер. Это предположение подтверждается и данными литературы о стимуляции окислительного фосфорилирования на первых этапах канцерогенеза, вызванного ААФ [1].

На первой стадии гепатоканцерогенеза активность АТФ-азы исчезающе мала. Известно, что на этой стадии канцерогенеза, вызванного ААФ, отмечаются стимуляция пролиферативных процессов и появление больших масс так называемых овальных клеток [8]. Вероятно, в этих клетках как клетках эмбрионального типа процессы гликолиза преобладают над процессами

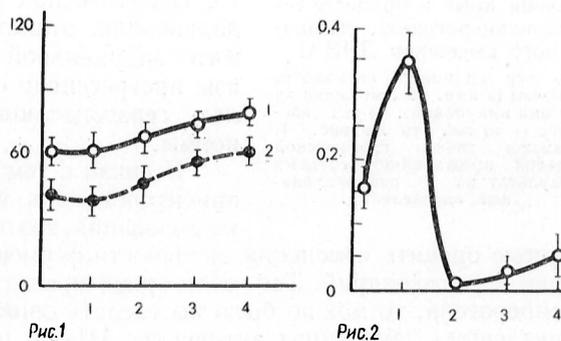


Рис. 1. Изменение активности солибилизированной АТФ-азы митохондрий печени крысы в ходе гепатоканцерогенеза, вызванного введением ААФ.

По оси ординат — активность препарата АТФ-азы (в  $\mu$ ммолях Рн на 1 мг белка за 15 мин инкубации); по оси абсцисс (здесь и на рис. 2 и 3): 1 — токсическая фаза, 2 — первая стадия, 3 — вторая стадия, 4 — третья стадия канцерогенеза.

Каждая точка графической кривой представляет средний результат из 6 индивидуальных определений.

Рис. 2. Изменение активности  $\mu$ МАО митохондрий клеток печени крыс в ходе гепатоканцерогенеза, вызванного ААФ.

1 — субстрат серотонин, 2 — субстрат норэпинефрин. По оси ординат — активность МАО митохондрий (в  $\mu$ ммолях аммиака на 1 мг белка за 60 мин инкубации); по оси абсцисс — то же, что на рис. 1. Каждая точка графической кривой представляет средний результат из 5—6 индивидуальных определений.

дыхания и фосфорилирования и митохондриальные мембраны содержат измененный пул ферментов. Кроме того, холангиолярный эпителий, выполняющий в значительной степени лишь структурную роль (формирование желчных капилляров), адаптирован, очевидно, к процессам гликолиза. На этой же стадии отмечается тенденция к повышению активности митохондриальной MAO.

На второй стадии канцерогенеза диффузная пролиферация овальных клеток сменяется их группированием и образованием адена из холангиолярного эпителия, в части случаев доброкачественные опухоли формируются и из гепатоцеллюлярного эпителия.

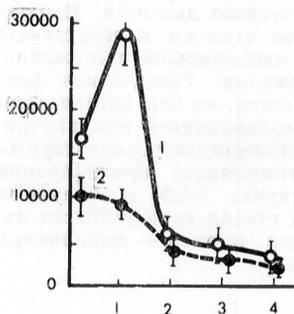


Рис. 3. Изменение активности АЦ-азы митохондрий (1) и цитоплазматических мембран (2) клеток печени крыс в процессе гепатоканцерогенеза, вызванного введением ДЭНА.

По оси ординат — активность АЦ-азы (в имп. на 1 мг белка за 60 мин инкубации); по оси абсцисс — то же, что на рис. 1. Каждая точка графической кривой представляет средний результат из 7 индивидуальных определений.

В этот период активность АТФ-азы составляет около 50% активности фермента интактных крыс. Активность митохондриальной MAO по отношению к контролю статистически достоверно повышается. Эта тенденция сохраняется и на стадии формирования холангиолярных раков.

В процессе гепатоканцерогенеза, вызванного ДЭНА, исследовалась активность АЦ-азы цитоплазматических и митохондриальных мембран (рис. 3). В токсическую фазу (фазу образования атипичных гепатоцитов — «пустых», зернистоэозинофильных и мелкобазофильных) изменений активности этого фермента не было выявлено. На стадии пролиферации атипичных клеток активность АЦ-азы митохондрий возрастает вдвое, тогда как активность фермента цитоплазматических мембран не меняется. На дальнейших этапах канцерогенеза активность митохондриальной и цитоплазматической АЦ-азы прогрессивно снижается и составляет в узлах гепатоцеллюлярных раков 40—50% от нормы.

В связи с тем что в наших наблюдениях мы ориентировались на данные гистологического исследования, это позволило с большей объективностью оценить изменения активности ферментов цитоплазматических мембран и митохондрий. Так, если ориентироваться только на сроки введения канцерогена, то можно было бы сделать ошибочное заключение о разнонаправленных изменениях активности АЦ-азы плазматических мембран и митохондрий в процессе канцерогенеза. Могла бы создаться иллюзия о «шунтировании» повышенной активностью АЦ-азы митохондрий практически исчезнувшей активности АЦ-азы плазматических мембран. Однако строгая «привязка» биохимических результатов, полученных у каждого подопытного животного, к данным гистологического исследования позволила избежать этой ошибки.

Полученные в настоящей работе экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что под влиянием химических канцерогенов возникают морфофункциональные сдвиги, проявляющиеся в стимуляции процессов пролиферации в ткани печени. Именно на этой стадии канцерогенеза выявляются изменения свойств митохондриальных мембран, выражающиеся в количественном, характерном и для дальнейших этапов канцерогенеза изменении активности маркерных ферментов. Это свидетельствует о том, что клетки, находящиеся в стадии дифференцировки, и клетки, находящиеся в стадии пролиферации, обладают различным набором ферментов, соответствующим их функциональным потребностям.

Выявленные изменения в основном сохраняются и на последующих стадиях бластомогенной трансформации. Это касается активности АТФ-азы и MAO. Учитывая исчезающе малую активность MAO плазматических мем-

бран опухолевых клеток [9], можно предположить, что повышение активности митохондриальной MAO отражает структурные и функциональные перестройки мембран внутриклеточных органелл на стадии пролиферации.

В случае гепатоканцерогенеза, вызванного ДЭНА, активность АЦ-азы в процессе опухолевого роста прогрессивно снижается. Это свидетельствует об уменьшении в трансформированных клетках функционального значения внутриклеточного регулятора — циклического аденозинмонофосфата — и отражает известное положение о снижении чувствительности опухолевых клеток к регуляторным воздействиям [10].

Таким образом, совокупность полученных результатов отражает, на наш взгляд, переход трансформированных под влиянием химических канцерогенов клеток уже на стадии пролиферации на новый тип регуляции клеточного гомеостаза в соответствии с новым типом метаболических процессов, свойственных дедифференцировке.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ходосова И. А. Биохимические аспекты канцерогенеза М., 1976. —
2. Третьяков А. В. — Цитология, 1973, № 2, с. 223. — 3. Третьяков А. В., Мухленов А. Г., Гуркало В. К. — Докл. АН СССР, 1976, т. 228, № 2, с. 494—497. — 4. Третьяков А. В. — Цитология, 1972, № 6, с. 736. — 5. Macdonald J. A. — *Experientia* (Basel), v. 30, p. 1485—1487. — 6. Goldberg N. O., Larner J., Sasko H. et al. — *Analyt. Biochem.*, 1969, v. 28, p. 523—544. — 7. Быкорез А. И., Пинчук В. Г. Экспериментальные опухоли печени. Киев, 1976. — 8. Вайсбургер Е., Вайсбургер Дж. — В кн.: Успехи в изучении рака. М., 1960, т. 5, с. 8—119. — 9. Горкин В. З., Давыдова С. Я. — *Вопр. мед. химии*, 1970, № 6, с. 591—594. — 10. Салямон Л. С. Рак и дисфункция клетки. Л., 1974.

Поступила 2/ХІ 1977 г.

#### ALTERATIONS IN ACTIVITY OF MONOAMINE OXIDASE, ADENYLATE CYCLASE AND ADENOSINE TRIPHOSPHATASE FROM RAT LIVER MITOCHONDRIA IN HEPATOCARCINOGENESIS

V. K. Gurkalo, A. V. Tretyakov

N. N. Petrov Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

Activity of specific mitochondrial enzymes was studied in rat liver during 2-acetylamine fluorene or diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. The results of enzymatic activities studied correlated with morphological changes in cancerogenesis. Alterations in activity of monoamine oxidase, adenylyl cyclase and adenosine triphosphatase depended on the step of cancerogenesis. Activity of adenylyl cyclase in cell membranes decreased gradually during the impairment. Change in activity of the enzymes, observed at the step of enhanced liver cell proliferation, proceeded at further steps of cancerogenesis. The data obtained suggest that alterations in activity of mitochondrial enzymes are related to modified metabolism observed in the impaired cells.

УДК 616.155.194.17-07:616.155.1-07

И. С. Луганова, М. Н. Блинов, А. С. Абдулкадырова

#### ВОЗРАСТНОЙ СОСТАВ ЭРИТРОЦИТАРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ, СОДЕРЖАНИЕ АТФ И 2,3-ДИФОСФОГЛИЦЕРАТА В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ НЕКОТОРЫХ ФОРМАХ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ АНЕМИЙ

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови, Ленинград

Эритроцитарную популяцию делили на три возрастные группы, используя в качестве критерия их устойчивость к осмотическому шоку и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ). В норме «старые» эритроциты составляют 8%, «зрелые» — 87%, «молодые» — 5%. При наследственном микросфероцитозе 70% эритроцитов имеют осмотическую резистентность и более высокую, чем в норме, активность Г-6-ФДГ. При болезни Маркиафавы — Микели среди «молодых» эритроцитов установлены две категории: одна — с нормальной осмотической стойкостью, другая — с пониженной. При функциональной ги-

*пербилирубинемии возрастной состав эритроцитарной популяции нормальный. В эритроцитах больных врожденным микросфероцитозом содержание АТФ снижено, при болезни Маркиафавы — Микели увеличено, у больных функциональной гипербилирубинемией оно находится в пределах нормы. Концентрация 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) в эритроцитах больных функциональной гипербилирубинемией не отличается от таковой в норме. У больных наследственным микросфероцитозом и болезнью Маркиафавы — Микели между уровнем гемоглобина в крови и содержанием 2,3-ДФГ существует обратная корреляция.*

Среди гематологических заболеваний большую группу составляют гемолитические анемии. Этиология гемолитических анемий разнообразна, однако в большинстве случаев повышенный гемолиз связан с биохимическими нарушениями в эритроцитах. Несмотря на множество этиологических факторов, приводящих к повышенной хрупкости эритроцитов, общей характерной чертой при всех разновидностях гемолитических анемий является укорочение продолжительности жизни красных клеток крови [1].

При адекватной способности регуляторных механизмов эритронона отвечать на повышенную деструкцию короткоживущих эритроцитов наблюдается интенсификация эритропоэза, в связи с чем анемизация у этих больных практически отсутствует. При нарушении компенсаторных механизмов в результате перенапряжения в системе эритронона возникает несостоятельность эритропоэза и как следствие развивается малокровие различной степени выраженности.

В обоих случаях можно ожидать изменения качественного состава эритроцитарной популяции, что будет выражаться как в перераспределении возрастных категорий клеток, так и в изменении метаболических показателей, определяющих функциональное состояние красных клеток крови.

Задачей настоящего исследования явилось сравнительное изучение возрастного состава эритроцитарной популяции у здоровых людей и больных наследственной микросфероцитарной гемолитической анемией, болезнью Маркиафавы — Микели и функциональной гипербилирубинемией.

Для оценки физиологического состояния эритроцитов изучали содержание в них АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) — соединений, имеющих важное значение для поддержания структурно-химической целостности эритроцитов, а также их способности осуществлять транспорт газов.

## М е т о д и к а

Возрастной состав эритроцитарной популяции определяли методом серийного осмотического гемолиза, последовательно обрабатывая плотно отцентрифужированные эритроциты растворами NaCl снижающейся концентрации (0,56, 0,44 и 0,32%), а затем дистиллированной водой. В гемолизатах определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), которая снижается с возрастом эритроцитов [2, 3]. Количество АТФ и Г-6-ФДГ определяли спектрофотометрически [2], 2,3-ДФГ — пентазиматическим методом [4, 5].

Биохимические показатели в эритроцитах были изучены у 28 больных наследственной микросфероцитарной гемолитической анемией, у 14 больных болезнью Маркиафавы — Микели и у 18 больных функциональной гипербилирубинемией (синдром Жильбера). У всех этих больных диагноз был предварительно установлен комплексным клинико-морфологическим, иммунологическим и биохимическим методами. Контролем служили эритроциты 25 здоровых периферических доноров крови в возрасте от 18 до 50 лет.

В группе больных наследственным микросфероцитозом у 5 человек в разные сроки до изучения биохимических показателей была произведена спленэктомия. У 7 больных наблюдалась анемия (уровень гемоглобина колебался от 41 до 83 г/л). Билирубинемия наблюдалась у большинства больных (непрямой билирубин до 5,12 мг на 100 мл). Количество ретикулоцитов, как правило, было повышенным (от 35 до 220<sup>0</sup>/<sub>00</sub>). Средний диаметр эритроцитов был ниже 6,4 мкм. Осмотическая стойкость эритроцитов у всех больных была снижена. Число лейкоцитов и лейкоцитарная формула были в пределах нормы. Проба Кумбса была отрицательная.

У больных болезнью Маркиафавы — Микели уровень гемоглобина колебался от 41 до 83 г/л, цветовой показатель был близок к единице, количество ретикулоцитов находилось в пределах 45—125<sup>0</sup>/<sub>00</sub>. У большинства больных отмечалась умеренная лейкопения и тромбоцитопения. Содержание билирубина в сыворотке крови колебалось от нормальных величин до 2,4 мг на 100 мл (реакция непрямая). Актив-

ность ацетилхолинэстеразы в строме эритроцитов была значительно снижена, пробы Хема и сахарозная — положительные, реакция Кумбса — отрицательная.

У больных с синдромом Жильбера все гематологические показатели были в пределах нормы. У всех больных наблюдалась гипербилирубинемия (непрямой билирубин от 1,28 до 2,56 мг на 100 мл).

### Результаты и обсуждение

Одним из критериев возраста эритроцитов, как известно, являются их осмотическая стойкость и активность ферментов, в частности Г-6-ФДГ, параллельное снижение которых наблюдается по мере старения этих клеток [6—9].

В табл. 1 приведены результаты сравнительного изучения возрастного состава эритроцитарных популяций в норме и у обследованных группы больных. Как видно из табл. 1, у здоровых людей относительно «старые» эритроциты (лизирующиеся в 0,56 и 0,44 % растворах NaCl) составляют около 8 % и активность в них Г-6-ФДГ значительно ниже, чем в основной массе клеток (около 90 %), разрушающихся в 0,32 % растворе NaCl, а также в небольшой части осмотически стойких «молодых» клеток, имеющих максимально высокую активность этого фермента.

Как и следовало ожидать, при наследственном микросфероцитозе существенно изменена осмотическая стойкость эритроцитов. По нашим данным, около 70 % эритроцитов лизируется в 0,56 и 0,44 % растворах NaCl, а количество осмотически резистентных клеток почти в  $2\frac{1}{2}$  раза меньше, чем в норме. Судя по активности Г-6-ФДГ, в 0,44 и 0,32 % растворах NaCl гемолизируются эритроциты одинаковой степени зрелости. Следует отметить, однако, что, несмотря на значительное уменьшение количества осмотически наиболее стойких, лизирующихся в воде клеток, в этой фракции гемолизата при микросфероцитарной анемии наблюдается более высокая активность Г-6-ФДГ, чем в норме. Это обусловлено, по-видимому, более высоким ретикулоцитозом, что свидетельствует об активации регенераторных процессов в системе эритрона при этом заболевании. Эти характерные особенности в составе возрастных категорий эритроцитов у больных наследственным микросфероцитозом сохраняются после спленэктомии и не зависят от степени выраженности анемии.

При болезни Маркиафавы — Микели в возрастном составе эритроцитарной популяции наблюдаются также некоторые изменения, но они имеют иной характер, чем у больных микросфероцитарной анемией. Как видно из приведенных данных, в эритроцитах этой группы больных не имеется количественных изменений в категориях клеток с различной чувствительностью к гипотоническим растворам по сравнению с нормой. Судя, однако, по активности Г-6-ФДГ в отдельных фракциях гемолизата, качественный состав эритроцитарной популяции у этих больных изменен, поскольку менее устойчивые к осмотическому лизису эритроциты имеют относительно высокую активность Г-6-ФДГ, что не позволяет их отнести к категории «старых» клеток. Этот факт говорит о том, что наряду с «молодыми», осмотически стойкими клетками, имеющими относительно высокую активность Г-6-ФДГ, существует еще и другая популяция «молодых» клеток, которые, по-видимому, неполноценны в функциональном отношении, так как их осмотическая резистентность снижена.

Результаты этих наблюдений хорошо согласуются с данными других исследователей, также обнаруживших посредством других методов исследования существование в эритроцитарной популяции больных пароксизмальной ночной гемоглобинурией по крайней мере двух категорий эритроцитов [10].

При изучении возрастного состава эритроцитов у больных функциональной гипербилирубинемией никаких существенных изменений по сравнению с нормой обнаружено не было. Можно лишь отметить небольшое перераспределение активности Г-6-ФДГ между категориями клеток, лизирующихся

Т а б л и ц а 1

Возрастной состав эритроцитарной популяции в норме у больных наследственным микросфероцитозом, болезнью Маркиафавы — Микели и функциональной гипербилирубинемией

Исследуемый показатель	Обследуемая группа	Осмотический гемолиз			
		в растворах NaCl			в дистиллированной воде
		0,56%	0,44%	0,32%	
Процент гемолизированных клеток	Здоровые лица (12)	0,2±0,03	8,0±1,51	87,0±2,0	4,8±0,80
	Больные: наследственным микросфероцитозом (15) <i>P</i>	5,4±1,72 <0,01	65,7±2,59 <0,01	26,9±3,52 <0,001	2,0±0,40 <0,01
	болезнью Маркиафавы — Микели (9) <i>P</i>	0,7±0,19 <0,05	11,5±2,49 >0,2	82,7±3,2 >0,2	5,2±0,83 >0,2
	функциональной гипербилирубинемией (18) <i>P</i>	—	6,2±0,75 >0,2	89,6±1,10 >0,5	4,2±0,44 >0,2
Активность Г-6-ФДГ в гемолизатах, мкмоль превращенного субстрата на 1 г Нв в минуту	Здоровые лица	2,7±0,30	2,6±0,20	4,8±0,20	5,7±0,40
	Больные: наследственным микросфероцитозом (15) <i>P</i>	2,9±0,17 >0,2	4,4±0,22 <0,001	4,2±0,28 <0,05	13,6±1,94 <0,001
	болезнью Маркиафавы — Микели (9) <i>P</i>	4,1±0,46 <0,05	5,1±0,37 <0,001	5,2±0,48 >0,1	13,8±1,61 <0,001
	функциональной гипербилирубинемией (18) <i>P</i>	—	2,9±0,19 >0,2	3,9±0,12 <0,05	9,9±1,20 <0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — число обследованных.

в 0,32 % NaCl и в дистиллированной воде, что, по-видимому, свидетельствует о некотором «омоложении» клеточной популяции у этой группы больных.

Как известно, среди важнейших фосфоорганических соединений в эритроцитах особая роль принадлежит АТФ и 2,3-ДФГ. Имеются прямые доказательства связи АТФ со структурно-химической целостностью эритроцитов и значения этого макроэргического соединения для поддержания формы клеток, катионного транспорта, обеспечения синтетических процессов, а также роли 2,3-ДФГ в транспорте этими клетками газов [11—13]. Извест-

Т а б л и ц а 2

Содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах в норме и у больных врожденным микросфероцитозом, болезнью Маркиафавы — Микели и функциональной гипербилирубинемией

Обследуемые группы	АТФ	2,3-ДФГ
	мкмоль на 1 г Нв	
Здоровые лица	3,3±0,15 (37)	14,4±0,46 (28)
Больные:		
наследственным микросфероцитозом	2,8±0,10 (28)	15,1±1,46 (18)
<i>P</i>	<0,05	>0,2
болезнью Маркиафавы — Микели	4,2±0,23 (14)	23,0±0,19 (14)
<i>P</i>	<0,01	<0,001
функциональной гипербилирубинемией	3,1±0,12 (18)	13,8±0,49 (18)
<i>P</i>	>0,5	>0,2

но также, что на содержание этих соединений в эритроцитах влияют различные факторы: степень зрелости клеток, их функциональное состояние, условия внешней среды и др. [14, 15].

В табл. 2 представлены результаты сравнительного изучения содержания АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах здоровых людей, больных наследственным микросфероцитозом, болезнью Маркиафавы — Микели и функциональной гипербилирубинемией.

Как видно из табл. 2, в эритроцитах больных наследственным микросфероцитозом наблюдается снижение содержания АТФ, что может быть обусловлено рядом причин. Одной из них является характерное для этих клеток нарушение катионного транспорта, обусловленное структурным дефектом мембран [16, 17]. В эритроцитах этих больных, как известно, повышено содержание Na<sup>+</sup>, для вытеснения избыточного количества которого увеличиваются активность K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-зависимой АТФ-азы и затраты АТФ [18]. Не менее важное значение в снижении содержания АТФ в эритроцитах больных с этой формой гемолитической анемии также могут иметь дефицит фосфорибозилпирофосфата и уменьшение активности рибозофосфатпирофосфокиназы и АМФ-пирофосфаткиназы, что приводит к нарушению способности эритроцитов использовать свободные азотистые основания для синтеза нуклеотидов, в частности АТФ [19]. Независимо от причин, вызывающих снижение содержания АТФ, уменьшение количества этого важнейшего соединения может сказываться на функциональном состоянии эритроцитов.

Согласно нашим данным, среднее содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах больных врожденной микросфероцитарной гемолитической анемией не отличается от нормы. Известно, однако, что одним из существенных факторов, влияющих на концентрацию 2,3-ДФГ, является уровень гемоглобина в крови. Между количеством гемоглобина и концентрацией 2,3-ДФГ существует обратная корреляция [12, 20], что является важнейшим адаптационным механизмом, обеспечивающим, несмотря на уменьшение уровня гемоглобина в крови, снижение его сродства к O<sub>2</sub> и тем самым улучшение тканевой оксигенации.

Как указывалось выше, среди обследованных больных наследственным микросфероцитозом у 7 человек наблюдалась анемия. При анализе результатов в зависимости от уровня гемоглобина в крови оказалось, что если у больных анемия отсутствовала, то содержание 2,3-ДФГ в красных клетках крови не отличалось от нормы. В тех случаях, когда уровень гемоглобина был ниже 80 г/л, отмечалось статистически достоверное увеличение концентрации 2,3-ДФГ. Таким образом, можно заключить, что при наследственном микросфероцитозе, несмотря на структурный дефект мембран эритроцитов и некоторое уменьшение содержания в этих клетках АТФ, эритроциты способны к реализации компенсаторно-приспособительных механизмов, о чем свидетельствует повышение концентрации 2,3-ДФГ при снижении уровня гемоглобина.

Как видно из табл. 2, в эритроцитах больных болезнью Маркиафавы — Микели имеет место значительное увеличение содержания АТФ и 2,3-ДФГ. Это связано, по-видимому, как с «омоложением» клеточного состава эритроцитарной популяции, так и с постоянно наблюдаемой у больных этой группы значительной анемизацией. Интересно отметить, что повышение количества АТФ в эритроцитах при болезни Маркиафавы — Микели коррелирует с увеличенным содержанием фосфорибозилпирофосфата и активностью ферментов его обменных превращений [19].

Эритроциты больных функциональной гипербилирубинемией не отличаются от эритроцитов здоровых ни содержанием АТФ, ни концентрацией 2,3-ДФГ.

Итак, в нормальной эритроцитарной популяции существует параллелизм между чувствительностью клеток к гипотоническим растворам и активностью Г-6-ФДГ. При наследственном микросфероцитозе наблюдаются количественные и качественные изменения возрастного состава эритроцитарной популяции: основную массу клеток (более 70%) составляют осмотически нестойкие эритроциты, которые, судя по активности маркерного энзима «возраста», являются относительно «молодыми» клетками. Эти результаты и данные о сниженном содержании в этих клетках АТФ свидетельствуют об их структурно-химической неполноценности. При болезни Маркиафавы — Микели отсутствуют статистически достоверные изменения по сравнению с нормой в категориях клеток с различной чувствительностью к гипотоническим растворам, однако при этом заболевании изменен качественный состав эритроцитарной популяции. Наряду со стойкими к осмотическому гемолизу «молодыми» клетками, имеющими относительно высокую активность Г-6-ФДГ, имеется другая категория «молодых» клеток, которые, по-видимому, неполноценны в функциональном отношении, поскольку их осмотическая резистентность значительно снижена. При функциональной гипербилирубинемии существенных нарушений в возрастном составе эритроцитарной популяции не наблюдается.

У больных наследственной микросфероцитарной гемолитической анемией и болезнью Маркиафавы — Микели не обнаружено изменений механизмов внутриклеточной адаптации, о чем свидетельствует увеличение содержания 2,3-ДФГ при снижении уровня в крови гемоглобина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Идельсон Л. И., Дидковский Н. А., Ермильченко Г. В. Гемолитические анемии. М., 1975, с. 38. — 2. Разумович А. Н., Науменко В. К. — Цитология, 1971, т. 13, с. 1124—1131. — 3. Луганова И. С., Харченко М. Ф., Блинов М. Н. и др. — Вопр. мед. химии, 1974, т. 20, с. 165—172. — 4. Дассе В., Вессман С. Р. — Arch. Environ. Hlth, 1973, v. 27, p. 112—115. — 5. Луганова И. С., Блинов М. Н. — Лабор. дело, 1975, № 11, с. 652—654. — 6. Данош Д., Мариковскы У., Скителски Е. — In: Red Cell Structure and Metabolism. New York, 1971, p. 23—38. — 7. Bishop C., Van Gastel C. — Haematol., 1969, Bd. 3, s. 29—34. — 8. Marks P. A., Szeinberg A., Fiorine T. — Scient. Rep. of Inst. of Cancer Res., 1960—1961, p. 37. — 9. Терсков И. А., Гительзон И. И. — В кн.: Вопросы биофи-

зики, биохимии и патологии эритроцитов. М., 1967, с. 41—48. — 10. Дульцина С. М. — Пробл. гематол., 1967, № 2, с. 28—31. — 11. Накао К., Вада Т., Камияма Т. — Nature, 1962, v. 194, p. 877—878. — 12. Brewer G. J., Eaton J. W. — Science, 1969, v. 221, p. 618—622. — 13. Benesch R., Benesch R. E. — Nature, 1969, v. 221, p. 618—622. — 14. Rapoport S. — Försvars medicine, 1969, Bd. 5, s. 168—174. — 15. Purcell Y., Brozovic B. — Nature, 1974, v. 251, p. 511—512. — 16. Miwa S. — Asian med. J., 1974, v. 17, p. 489—495. — 17. Kirkpatrick F. H., Woods G. M., La Celle L. Blood., 1975, v. 46, p. 945—954. — 18. Wiley J. S. — Brit. J. Haematol., 1972, v. 22, p. 529—542. — 19. Блинов М. Н., Камышенцев М. В., Луганова И. С. и др. — Вопр. мед. химии, 1976, т. 22, с. 456—461. — 20. Eaton J. W., Brewer G. J., Schultz J. S. Red Cell Metabolism and Function. Ed. G. Brewer. New York, 1970, p. 137—153.

Поступила 17/V 1977 г.

## AGE COMPOSITION OF ERYTHROCYTE POPULATION AND CONTENT OF ATP AND 2,3-DIPHOSPHOGLYCERATE IN ERYTHROCYTES UNDER SOME FORMS OF HEMOLYTIC ANEMIAS

I. S. Luganova, M. N. Blinov, A. S. Abdulkadyrova

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Leningrad

The total erythrocyte population was subdivided into three age groups using as criteria the stability of red blood cells to osmotic shock and the values of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity. The «old» erythrocytes constituted about 8%, «mature» — 87% and «young» — 5% under normal conditions. In hereditary microspherocytosis 70% of erythrocytes possessed a decreased osmotic resistance and higher G6PD activity as compared with normal state. Two categories of erythrocytes was found among «young» cells in Marchiafava-Micheli disease; one of them possessed normal osmotic resistance, the other — decreased osmotic resistance. The age composition of the erythrocyte population was normal in functional hyperbilirubinemia. Content of ATP was decreased in erythrocytes of patients with hereditary microspherocytosis, it was increased in Marchiafava-Micheli disease and approached the normal level in patients with functional hyperbilirubinemia. Concentration of 2,3-diphosphoglycerate was similar to the normal level in erythrocytes of patients with functional hyperbilirubinemia; an inverse correlation was observed between contents of hemoglobin and of 2,3-diphosphoglycerate in blood of patients with hereditary microspherocytosis and with Marchiafava-Micheli disease.

УДК 612.452.018.015.3

Н. П. Чеснокова

## ВЛИЯНИЕ АКТИВНОСТИ АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ НА СОДЕРЖАНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ В ТКАНЯХ

Кафедра патологической физиологии Саратовского медицинского института

*В опытах на кошках показано, что демедулляция надпочечников приводит к снижению экскреции адреналина и ваниллимандальной кислоты при одновременном увеличении содержания адреналина в различных органах. Предварительная демедулляция надпочечников в значительной мере препятствовала тем изменениям метаболизма катехоламинов, которые свойственны ботулинической или столбнячной нейроинтоксикации. Последнее дает возможность сделать вывод о том, что в генезе обнаруженных изменений метаболизма катехоламинов при ботулинической и столбнячной интоксикациях важная роль принадлежит активации адренергических процессов.*

При ботулинической интоксикации возникают выраженные нарушения обмена катехоламинов, характеризующиеся усилением их мобилизации из надпочечников, накоплением в гипоталамических структурах, стадийными изменениями соотношения адреналина и норадреналина в органах в зависимости от тяжести интоксикации [1].

Учитывая литературные данные о том, что в динамике интоксикации возникает выраженная вегетативная дистония, характеризующаяся исключением холинергических влияний и активацией адренергических процессов [2—5], целесообразно было выяснить, не связаны ли обнаруженные нарушения обмена биогенных аминов с первичной активацией симпатико-адреналовой системы. Для частичного решения этого вопроса были постав-

лены опыты на кошках с «обратимым торможением» активности адренергических процессов, а также на предварительно демедуллированных животных, затравленных ботулиническим или столбнячным нейротоксином. Указанная модификация позволяла выяснить влияние обратимого подавления адренергических процессов на метаболизм тканевых катехоламинов, а также на характер изменения обмена катехоламинов при нейроинтоксикациях, сопровождающихся активацией симпатико-адреналовой системы.

### М е т о д и к а

Опыты поставлены на кошках массой 3—4 кг. Проведено несколько серий исследований: на интактных кошках, демедуллированных, а также на предварительно демедуллированных и затравленных ботулиническим и столбнячным токсином. Операция демедулляции заключалась в удалении одного надпочечника и выжигании мозгового вещества другого надпочечника. Опыты на демедуллированных животных поставлены на 7—8-е сутки после операции в период максимального торможения адренергических влияний [6]. Опыты на отравленных животных осуществлены через 2 сут после внутривенного введения ботулинического токсина типа С в дозе 2,5 мг на 1 кг массы животного на фоне паралитического синдрома, а также через 2—3 сут после введения столбнячного токсина в той же дозе при развитии клинических проявлений тяжелого генерализованного столбняка. Часть экспериментов поставлена на кошках, затравленных столбнячным или ботулиническим токсином на 6—7-е сутки после демедулляции. В указанных модификациях экспериментов изучали экскрецию с мочой адреналина, норадреналина, ванилилминдальной кислоты, а также содержание катехоламинов в различных органах и тканях: надпочечниках, гипоталамусе, двигательной зоне коры головного мозга, мозжечке, спинном мозге, мышце, сердце, печени, почках.

Содержание катехоламинов определяли общепринятым триоксииндоловым методом в модификации В. В. Меньшикова [7], а экскрецию ванилилминдальной кислоты — методом низковольтного электрофореза [8].

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

Результаты опытов, поставленных на демедуллированных животных, свидетельствовали о том, что «обратимое торможение» активности адренергических влияний сопровождалось значительным уменьшением выделения

Т а б л и ц а 1

Экскреция катехоламинов и ванилилминдальной кислоты в суточной моче демедуллированных кошек

Серия	Адреналин, мкг/сут	Норадреналин, мкг/сут	Ванилилминдальная кислота, мг/сут
Контроль (14)	0,97±0,087	1,9±0,1	0,33±0,04
Демедулляция (10)	0,43±0,045 <i>P</i> <0,001	1,66±0,23	0,15±0,03 <i>P</i> <0,01
Демедулляция + адреналин (10)	0,65±0,05 <i>P</i> =0,02	1,73±0,13	0,47±0,09 <i>P</i> >0,1

П р и м е ч а н и е. *P* рассчитано по отношению к контролю. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках — число животных.

с мочой адреналина, а также одного из основных продуктов обмена катехоламинов — ванилилминдальной кислоты. При этом экскреция норадреналина не изменялась (табл. 1).

Естественно было предположить, что удаление основного депо катехоламинов — мозгового вещества надпочечников — может привести и к уменьшению их содержания в тканях. Однако, как показали эксперименты, количество адреналина резко возрастало в мозжечке, гипоталамусе, коре, спинном мозге, икрожных мышцах. В то же время уровень адреналина не

отличался от контроля в сердце и почках. Содержание норадrenalина не изменялось во всех вышеперечисленных структурах и лишь в печени имело место некоторое его снижение. Определение содержания катехоламинов в оставшемся после выжигания мозгового вещества надпочечнике свидетельствовало о чрезвычайно низком уровне в нем как адреналина, так и норадrenalина (табл. 2 и 3).

Таким образом, возрастание содержания адреналина в тканях демедулированных животных в определенной степени может быть следствием торможения инактивации катехоламинов, о чем свидетельствует снижение экскреции с мочой ванилилминдальной кислоты — продукта окислительного дезаминарования и метилирования катехоламинов в различных органах и тканях.

В последующих экспериментах с введением компенсаторных доз адреналина демедулированным животным (см. табл. 1) отмечено возрастание выделения с мочой адреналина и ванилилминдальной

кислоты, при этом экскреция норадrenalина не изменялась. Во многих исследуемых органах содержание адреналина снижалось и достигало контрольных величин. Между тем в изменении содержания норадrenalина не было отмечено какой-либо определенной закономерности: в ряде органов его содержание оставалось в пределах контрольных величин, в почках и мозжечке снижалось, а в седалищных нервах и гипоталамусе заметно превышало контроль (см. табл. 2 и 3).

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что удаление мозгового вещества надпочечников и связанное с ним торможение активности адренергических влияний [6] закономерно приводит к увеличению содержания адреналина в тканях.

Далее представляло интерес выяснить, какое влияние окажет предварительная демедуляция надпочечников на содержание катехоламинов в органах кошек при последующем развитии у них столбнячной или ботулинической интоксикации (табл. 4). Как известно, указанные нейротоксикации сопровождаются активацией адренергических процессов [9—11] и определенными изменениями обмена катехоламинов [1, 12]. В частности, на паралитической стадии ботулинической интоксикации отмечено значительное преобладание норадrenalина в тканях.

Как показали результаты экспериментов на демедулированных, затравленных ботулиническим токсином животных, предварительное торможение активности адренергических процессов препятствовало развитию тех изменений обмена катехоламинов, которые были отмечены нами ранее на поздней стадии интоксикации у неоперированных кошек. При этом содержание адреналина не отличалось от контроля во всех исследуемых органах и лишь в гипоталамусе оставалось выше нормы, как и в группе демедулированных незатравленных животных. Уровень норадrenalина не отличался от контроля в спинном мозге, мышце, сердце, печени, почках и оставался выше контроля в гипоталамусе, коре, мозжечке.

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень тканевых катехоламинов находится в определенной зависимости от активности симпатико-адреналовой системы. Причем подавление адренергических процессов у де-

Таблица 2  
Содержание катехоламинов в органах и тканях контрольных кошек, мкг/г ( $M \pm m$ )

Орган, ткань	Адреналин	Норадrenalин
Кора (14)	0,06±0,006	0,21±0,013
Гипоталамус (14)	0,09±0,007	0,17±0,010
Мозжечок (14)	0,08±0,008	0,21±0,011
Спинальный мозг (14)	0,07±0,005	0,24±0,012
Седалищный нерв (10)	0,05±0,009	0,3±0,012
Икроножная мышца (14)	0,09±0,009	0,20±0,010
Сердце (16)	0,09±0,008	0,21±0,009
Печень (14)	0,09±0,006	0,22±0,013
Почки (14)	0,08±0,006	0,32±0,017
Надпочечники (20)	265,9±8,9	55,9±3,6

Влияние демедулляции надпочечников на содержание катехоламинов в органах и тканях кошек

Орган, ткань	Демедулляция				Демедулляция и введение адреналина				
	адреналин, мкг/г	P	норадреналин, мкг/г	P	адреналин, мкг/г	P	норадреналин, мкг/г	P	P <sub>1</sub>
Гипоталамус (10)	0,26±0,02	<0,001	0,15±0,03	>0,5	0,21±0,03	<0,02	0,31±0,03	<0,01	0,01
Мозжечок (16)	0,11±0,02	<0,001	0,25±0,04	>0,5	0,09±0,02	>0,5	0,14±0,02	<0,02	0,02
Кора (11)	0,19±0,03	<0,001	0,25±0,03	>0,25	0,08±0,01	>0,5	0,21±0,03	>0,25	0,25
Спинной мозг (11)	0,42±0,02	<0,001	0,46±0,04	>0,5	0,17±0,03	>0,02	0,31±0,02	>0,05	>0,5
Икрожные мышцы (11)	0,22±0,02	<0,001	0,19±0,03	>0,5	0,11±0,01	>0,1	0,24±0,03	>0,1	>0,1
Сердце (16)	0,12±0,02	>0,05	0,16±0,03	>0,05	0,12±0,03	>0,1	0,27±0,03	>0,1	<0,05
Печень (11)	0,18±0,03	<0,02	0,11±0,01	<0,001	0,11±0,02	>0,1	0,26±0,05	>0,25	<0,02
Почки (16)	0,09±0,01	>0,5	0,27±0,04	>0,05	0,08±0,009	>0,5	0,18±0,023	<0,001	<0,05
Надпочечник (11) (оставшийся после выжигания мозгового вещества)	17,3±0,8	<0,001	8,0±0,8	<0,001	15,7±0,2	<0,001	10,1±1,1	<0,001	>0,5

Примечание. P — рассчитано по отношению к контролю, P<sub>1</sub> — по отношению к группе демедуллированных животных.

медуллированных животных способствует накоплению катехоламинов в тканях и в значительной мере препятствует развитию тех изменений, которые свойственны ботулинической интоксикации.

Аналогичный вывод о чрезвычайно важной роли активности адренергических процессов в метаболизме тканевых катехоламинов был сделан в модификациях опытов с воспроизведением столбнячной интоксикации на предварительно демедуллированных животных. Как показали эксперименты, развитие генерализованной столбнячной интоксикации, сопровождающейся активацией адренергических влияний, приводит к снижению уровня норадреналина и преобладанию адреналина в ряде органов и тканей.

Развитие столбнячной интоксикации у демедуллированных кошек сопровождалось иными изменениями содержания норадреналина: его содержание резко возросло по сравнению с соответствующей стадией интоксикации у неоперированных животных и достигало контрольных величин в коре головного мозга, мозжечке, спинном мозге, икрожных мышцах и печени. В гипоталамусе его содержание даже превысило контрольный уровень. Однако демедулляция не отражалась на содержании адреналина в тканях затравленных животных: оно значительно превышало контроль и практически не отличалось от тех результатов, которые были получены в группе неоперированных затравленных животных.

Резюмируя приведенные данные, следует отметить, что содержание катехоламинов в различных органах и тканях в значительной степени определяется актив-

ностью симпатико-адреналовой системы. Торможение адренергических процессов в условиях демедулляции надпочечников приводит к увеличению суммарного содержания катехоламинов в тканях в основном за счет адреналина. Предварительная демедулляция надпочечников в оп-

Т а б л и ц а 4

Влияние демедулляции надпочечников на содержание катехоламинов в органах и тканях кошек при ботулинической или столбнячной интоксикации

Орган, ткань	Ботулиническая интоксикация					
	адреналин, мкг/г	<i>P</i>	<i>P</i> <sub>1</sub>	норадреналин, мкг/г	<i>P</i>	<i>P</i> <sub>1</sub>
Гипоталамус	0,21±0,05	<0,001	>0,1	0,62±0,12	<0,001	>0,5
Мозжечок	0,08±0,02	>0,5	>0,05	0,30±0,04	<0,05	>0,05
Кора	0,06±0,01	>0,5	<0,01	0,30±0,03	<0,02	<0,001
Спинальный мозг	0,11±0,019	>0,25	<0,01	0,27±0,03	>0,5	>0,1
Икроножные мышцы	0,07±0,012	>0,1	>0,5	0,23±0,03	>0,5	>0,5
Сердце	0,07±0,01	>0,1	>0,1	0,26±0,04	>0,5	>0,5
Печень	0,14±0,03	>0,2	<0,05	0,27±0,05	>0,2	>0,5
Почки	0,07±0,002	>0,5	>0,05	0,37±0,03	>0,1	>0,25
Надпочечник, оставшийся после выжигания мозгового вещества	15,1±1,6	0,001	>0,2	25,9±1,6	0,001	0,01

Орган, ткань	Столбнячная интоксикация					
	адреналин, мкг/г	<i>P</i>	<i>P</i> <sub>1</sub>	норадреналин, мкг/г	<i>P</i>	<i>P</i> <sub>1</sub>
Гипоталамус	0,33±0,04	<0,001	<0,05	0,31±0,05	<0,05	>0,5
Мозжечок	0,15±0,02	<0,01	>0,5	0,20±0,03	>0,5	<0,01
Кора	0,17±0,02	<0,001	<0,05	0,26±0,03	>0,1	<0,01
Спинальный мозг	0,22±0,03	<0,001	>0,5	0,33±0,06	>0,1	<0,02
Икроножные мышцы	0,15±0,02	<0,01	>0,5	0,18±0,04	>0,5	<0,01
Сердце	0,16±0,02	<0,01	>0,5	0,26±0,006	>0,5	<0,02
Печень	0,15±0,01	<0,001	>0,5	0,26±0,04	>0,5	<0,01
Почки	0,08±0,01	>0,5	<0,001	0,21±0,03	<0,01	<0,001
Надпочечник, оставшийся после выжигания мозгового вещества	16,5±1,4	0,001	0,001	13,1±2,36	<0,001	<0,001

Примечание. *P* рассчитано по отношению к контролю, *P*<sub>1</sub> — к соответствующей стадии интоксикации без демедулляции, число животных в каждой группе составило от 9 до 12.

ределенной степени препятствует возникновению тех изменений метаболизма катехоламинов, которые были обнаружены ранее при ботулинической или столбнячной интоксикации. Последнее дает возможность сделать вывод о том, что изменения содержания катехоламинов в тканях при исследуемых нейроинтоксикациях могут быть следствием первичной активации адренергических процессов.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ч е с н о к о в а Н. П. — В кн.: Патологическая физиология инфекционного процесса и аллергии. Саратов, 1973, с. 158. — 2. М и х а й л о в В. В. — Бюлл. экспер. биол., 1956, № 1, с. 42. — 3. A m b a c h e N. — J. Physiol. (Lond.), 1952, v. 116, p. 9. — 4. A m b a c h e N. — Nature, 1948, v. 161, p. 482. — 5. H u c o v i c S., S t e g n P. — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. exp. Path., 1966, Bd 254, S. 401. — 6. М е н ь ш и к о в В. В. — Лабор. дело, 1961, № 4, с. 18. — 7. М е н ь -

шиков В. В., Большакова Т. Д. — Кардиология, 1963, № 5, с. 91. — 8. Corbett J. L. et al. — Anaesthesia, 1969, v. 24, p. 198. — 9. Corbett J. L., Harris P. J. — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol., 1973, Bd 276, S. 447. — 10. Михайлов В. В., Асланова Н. К. — В кн.: Научная сессия Астраханского мед. ин-та. 43-я. Тезисы докладов. Астрахань, 1961, с. 123—125. — 11. Михайлов В. В., Чеснокова Н. П. — Бюлл. экспер. биол., 1971, № 1, с. 20.

Поступила 24/IX 1977 г.

## EFFECT OF ACTIVITY OF ADRENERGIC PROCESSES ON CONTENT OF CATECHOLAMINES IN TISSUES

N. P. Chesnokova

Chair of Pathophysiology, Medical School, Saratov

Demodulation of adrenal glands caused a decrease in excretion of adrenaline and vanillyl mandelic acid with simultaneous increase of adrenaline content in various rat tissues. Pre-demodulation of adrenal glands prevented distinctly the alterations in catecholamine metabolism, which developed in botulinic and tetanic neurointoxications. The data obtained suggest that activation of adrenergic processes is of importance in genesis of the alterations observed in catecholamine metabolism under conditions of botulinic and tetanic intoxications.

УДК 612.115.1.014.46:577.112.383.2

А. Ш. Бышевский, Т. М. Лануева, И. А. Мухачева

## ВЛИЯНИЕ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА НА ОБРАЗОВАНИЕ И ЛИЗИС ФИБРИНА

Кафедра биохимии Тюмского медицинского института

Установлено, что фосфатидилсерин тормозит неферментативный этап фибринообразования (самосборку фибрин-мономера), не влияя на активность фактора XIII, на степень ретракции сгустка и его толерантность к фибринолизу. Активность фибринолизина не изменяется в присутствии фосфатидилсерина, но эффект медленнодействующего антиплазмينا на фибринолизин несколько ограничивается липоидом. Это приводит к тому, что фибринолиз в естественной системе (плазма) фосфатидилсерином активизируется.

Полученные данные согласуются с обоснованным авторами ранее представлением о механизме торможения фосфатидилсерином реакции тромбин — фибриноген.

Ранее мы показали, что фосфатидилсерин угнетает не только активацию протромбина, но и реакцию тромбин — фибриноген [1], образуя малоактивные комплексы с тромбином [2]. Так как активность тромбина принято оценивать по времени свертывания фибриногена и образование фибрина протекает в 2 этапа, один из которых не зависит от тромбина (этап полимеризации или самосборки фибрин-мономера) [3—5], в настоящей работе изучали влияние фосфатидилсерина на неферментативной этап фибринообразования.

Одновременно исследовали влияние фосфатидилсерина на фибринолитический процесс, катализируемый фибринолизинотом (плазмин, КФ 3. 4. 4. 14), который, как и тромбин, является гидролазой. Судя по данным литературы [6], можно ожидать, что фосфатидилсерин контролирует активность многих ферментов этого класса.

### Методика

В экспериментах использовали эмульсию гомогенного препарата фосфатидилсерина и эмульсию препарата, содержащего наряду с фосфатидилсерином сфингомиелин и фосфатидилэтанолламин. Последние 2 липоида не влияют на гемокоагуляцию [1], но обеспечивают стабильность эмульсии фосфатидилсерина, увеличивая длительность его сохранения в кровотоке [7]. Эмульсии индивидуального фосфатидилсерина и стабилизированные эмульсии, адекватные по содержанию фосфатидилсерина, оказывали в опытах идентичное влияние на изучавшиеся величины. В статье приведены данные, полученные при изучении эмульсии стабилизированного фосфа-

тидилсерина. Такая эмульсия (в связи со стабильностью) является более перспективным антикоагулянтом для использования *in vivo* [7].

Индивидуальный фосфатидилсерин и фосфатидилсерин с примесью сфингомиелина и фосфатидилэтанолamina (соответственно 50,1, 25,6 и 24,3%) получали из бычьего мозга [8], оценивая однородность и состав хроматографически [9].

Интенсивность самосборки фибрин-мономера изучали 2 приемами: определяли время образования сгустка при разведении 0,14 М раствором NaCl фибриногена, преинкубированного с тромбином в 40% растворе мочевины [10], устанавливали скорость полимеризации фибрин-мономера, освобожденного от фактора XIII [11]. Активность фактора XIII определяли, как описано ранее [12], а степень ретракции сгустка — по объему сыворотки, отделившейся при инкубации (37°C, 1 ч) рекальцифицированной плазмы [13]. Толерантность фибрина к плазмину находили по времени лизиса сгустка, образованного из 2 мл раствора фибрин-мономера в 1 мл раствора фибринолизина (2 мг/мл). Фибринолитическую активность плазмы определяли на фибриновых пластинках [14], активность растворов фибринолизина и влияние на нее суммы антиплазминов плазмы — по интенсивности лизиса казеина. Активность быстро и медленно действующих антиплазминов оценивали по их влиянию на интенсивность лизиса взвеси фибрина фибринолизинном [15]. Суммарный антиплазмин получали из бычьей плазмы [16]. В опытах использован тромбин без плазминогена (Каунас) и фибринолизин (г. Горький). Во всех экспериментах в среду, где протекает исследуемая реакция, вносили эмульсию препарата фосфатидилсерина в 0,14 М растворе NaCl (рН эмульсий 7,4), в контроль — соответствующий объем растворителя. Концентрация фосфатидилсерина в отдельных экспериментах указана при изложении результатов исследований.

### Результаты и обсуждение

В присутствии фосфатидилсерина скорость полимеризации образованного в 40% растворе мочевины фибрин-мономера замедляется пропорционально концентрации фосфолипида (табл. 1).

Та же закономерность более четко выявилась при использовании в опытах фибрин-мономера, очищенного путем трехкратного повторения этапов полимеризации и растворения [11]. В этом случае зависимость между пар-

Таблица 1

Время полимеризации фибрин-мономера, образованного в 40% растворе мочевины при разбавлении его 0,14 М раствором NaCl, содержащим и не содержащим фосфатидилсерин

Концентрация фосфатидилсерина в растворе NaCl, мг в мл	Число опытов	Время образования сгустка, с ( $M \pm m$ )	<i>P</i>	Парциальное торможение $\left(1 - \frac{Y_0}{Y_K}\right)$
0,0	6	125 ± 1,7	—	0,0
0,015	3	155 ± 9,0	0,05	0,23
0,030	3	150 ± 3,0	0,05	0,20
0,060	3	243 ± 2,2	0,05	0,51
0,120	3	258 ± 5,8	0,05	0,57
0,250	3	305 ± 2,4	0,05	0,60
0,500	3	311 ± 1,5	0,05	0,61

Примечание.  $Y_K$  и  $Y_0$  — соответственно скорость реакции в контроле и опыте.

циальным торможением (*i*) и концентрацией фосфатидилсерина в среде, где проходила полимеризация, характеризуется гиперболической кривой (рис. 1).

Известно, что стабильность фибрина в значительной степени зависит от фактора XIII, недостаточность или отсутствие которого ведет к нарушению ультраструктуры сгустка фибрина [17]. Внося в плазму, использовавшуюся для определения активности фактора XIII, фосфатидилсерин (1 и 2 мг/мл), мы не нашли заметного влияния липоида на скорость растворения сгустка фибрина в растворе кислого оксалата аммония: растворение в контроле длилось 37,0 ± 0,24, в опыте — 34,0 ± 0,39 и 35,1 ± 0,30 с (при концентрации фосфатидилсерина 1 и 2 мг/мл плазмы соответственно). Таким образом, фиб-

ринстабилизирующий эффект фактора XIII не изменяется в присутствии фосфатидилсерина.

Фосфатидилсерин не оказывал влияния на толерантность к фибринолизину сгустков фибрина, образованных из фибрин-мономера (табл. 2).

Так как устойчивость фибринового сгустка к фибринолизину зависит, в частности, и от уровня фактора XIII [5], приведенные данные подтверж-

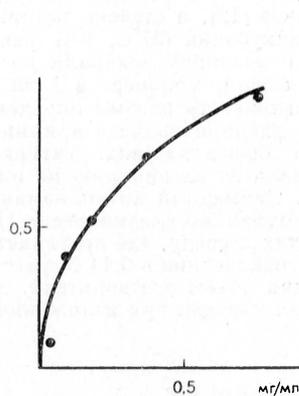


Рис. 1. Зависимость парциального торможения ( $i$ ) скорости полимеризации фибрин-мономера от концентрации фосфатидилсерина.

По оси абсцисс — концентрация фосфатидилсерина в среде, где происходит полимеризация фибрин-мономера; по оси ординат — парциальное торможение.

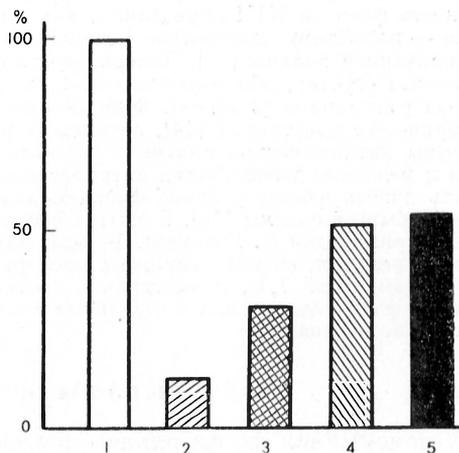


Рис. 2. Влияние фосфатидилсерина на интенсивность торможения фибринолизина суммарным антиплазмином плазмы.

1 — активность фибринолизина в контроле (принята за 100%); 2 — активность фибринолизина в присутствии антиплазминов; 3, 4, и 5 — активность фибринолизина в присутствии антиплазминов при разных концентрациях фосфатидилсерина (1,9; 2,2 и 4,4 мг/мл соответственно).

дают, что исследуемый фосфатид не влияет на стабилизацию фибрина этим ферментом.

Одна из качественных характеристик сгустка фибрина — способность его к ретракции [18]. В наших экспериментах количество отделяемой сгустком жидкости не зависело от присутствия в плазме фосфатидилсерина (0,3—3,0 мг/мл).

Казениолитическая активность фибринолизина в присутствии фосфатидилсерина не изменялась: активность фибринолизина в контроле —  $2,1 \pm$

Таблица 2

Время лизиса фибринолизинем сгустков фибрина, образованных из фибрин-мономера при разбавлении его в 0,14 M растворе NaCl, не содержащем (контроль) и содержащем фосфатидилсерин ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Исследуемый показатель	Концентрация фосфатидилсерина в среде, где происходила полимеризация фибрин-мономера, мг/мл					
	0,0	0,06	0,12	0,25	0,50	1,00
Время лизиса, с	$193 \pm 5,6$	$183 \pm 6,5$	$196 \pm 6,0$	$208 \pm 7,0$	$206 \pm 3,5$	$196 \pm 8,1$
$P$	—	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

$\pm 0,1$  мкг тирозина, а в присутствии фосфатидилсерина (0,1—1,6 мг/мл) —  $2,26 \pm 0,18$  мкг тирозина ( $P > 0,05$ ). При исследовании фибринолитической активности цельной плазмы обнаружилось активирующее влияние фосфатидилсерина: площадь зон, лизированных донорской плазмой (18 опытов), равна  $55,0 \pm 1,75$  мм<sup>2</sup>, в присутствии фосфатидилсерина (соответственно 0,1,

0,2 и 0,4 мг/мл) площадь зон лизиса равнялась  $66,1 \pm 0,2$ ;  $60,0 \pm 2,2$  и  $62,0 \pm 3,2$  мм<sup>2</sup> (6 опытов в каждом случае,  $P < 0,05$ ). Активирующий эффект, как это видно из приведенных данных, невелик и не зависит от концентрации фосфатидилсерина.

Отсутствие влияния фосфатидилсерина на изолированный фибринолизин и его активирующее влияние на фибринолитическую активность цельной плазмы побудили нас изучить активность антиплазминов в присутствии фосфатидилсерина. Обнаружилось, что суммарный антиплазмин плазмы, заметно подавляющий активность раствора фибринолизина, утрачивает

Т а б л и ц а 3

Активность быстро и медленно действующего антиплазмина сыворотки крови (в %) в присутствии фосфатидилсерина ( $M \pm m$ )

Антиплазмины	Концентрация фосфатидилсерина в среде, мг/мл				
	0,0	0,04	0,08	0,16	0,25
Быстро действующий <i>P</i>	$80,2 \pm 3,6$ —	$77,1 \pm 0,2$ > 0,05	$75,0 \pm 0,6$ > 0,05	$83,2 \pm 0,9$ > 0,05	$81,2 \pm 0,9$ > 0,05
Медленно действующий <i>P</i>	$59,0 \pm 0,2$ —	$51,1 \pm 0,6$ > 0,05	$48,2 \pm 0,3$ > 0,05	$49,1 \pm 0,1$ > 0,05	$40,2 \pm 0,1$ < 0,05

часть ингибирующего влияния в присутствии фосфатидилсерина. Как и в опытах с цельной плазмой, эффект фосфатидилсерина мало зависит от концентрации (рис. 2): ингибирующее влияние антиплазминов на фибринолизин снижается в одинаковой степени в присутствии существенно отличающихся концентраций фосфатидилсерина — 2,2 и 4,4 мг/мл.

Изучение влияния фосфатидилсерина на активность быстро и медленно действующих антиплазминов сыворотки позволило установить, что только в наибольшей из исследованных концентраций (0,25 мг/мл) липоид достоверно ограничивал активность медленно действующего антиплазмينا (табл. 3).

По-видимому, угнетающее влияние фосфатидилсерина на медленно действующий антиплазмин обуславливает активацию им фибринолиза в цельной плазме и активацию изолированного фибринолизина в присутствии суммы антиплазминов плазмы.

Ранее мы показали, что фосфатидилсерин тормозит реакцию тромбин — фибриноген по типу сопряженного торможения, образуя малоактивный комплекс фермент — субстрат — ингибитор [1,19]. Описанное в настоящей работе свойство фосфатидилсерина тормозить вторую фазу фибринообразования согласуется с представлением о сопрягающем характере ингибиторного влияния фосфолипида на реакцию тромбин — фибриноген: можно допустить, что фосфатидилсерин, способный к образованию комплексов доказана прямыми наблюдениями [2], может образовывать комплексы и с фибрин-мономером — продуктом ферментативного превращения фибриногена. В этом случае фосфатидилсерин, вступая в связь с 2 компонентами реакции, повышает сродство между ними, что ведет к снижению скорости распада комплекса, т. е. к торможению сопрягающего типа.

Влияние фосфатидилсерина на фибринолитический процесс невелико при сравнительно высоких концентрациях липоида. Видимо, в организме фосфатидилсерин не может оказывать существенного влияния на активность фибринолиза.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бышевский А. Ш., Мухачева И. А. — «Биохимия», 1976, № 3, с. 543—548.
2. Мухачева И. А., Бышевский А. Ш. — Там же, № 4, с. 2130—2135.
3. Sorley A. — «Postepy Biochem.», 1968, v. 14, p. 343—348.

4. Lipińskie В. — Ibid., p. 373—381. — 5. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М., 1975, с. 165—251, 219—221. — 6. Грибанов Г. А. — «Успехи совр. биол.», 1975, т. 80, № 3, с. 382—398. — 7. Мухачева И. А. Липоидный антикоагулянт, свойства, противосвертывающее начало, механизм влияния на гемокоагуляцию. Автореф. дис. канд. М., 1976. — 8. Klepek E., Vöht P. — «Hoppe-Seylers physiol. Chem.», 1951, Bd 288, S. 99—107. — 9. Жукон А. В., Верещакгин А. Г. Физиол. и биохимия культ. растени. 1970, т. 2, с. 93. — 10. Вулик К., Малюфиеjew М. — «Roczn. Akad. Med. Bialystoku», 1955, v. 1, p. 159—171. — 11. Радзевич И. М., Ходорова Е. Л. — «Укр. біохім. ж.», 1969, № 4, с. 367—370. — 12. Исследование факторов свертывания крови. Метод. указания. Л., 1971, с. 57—58. — 13. Балуда В. П., Малярковский В. Н., Ойвин И. А. Лабораторные методы исследования свертывания системы крови. М., 1962, с. 125—126. — 14. Перлик Э. Антикоагулянты. Л., 1965, с. 341—342. — 15. Вержиковская В. Г., Бышевский А. Ш. — «Лабор. дело», 1973, № 2, с. 94—96. — 16. Белик Я. В., Ходорова Е. Л. Биохимия свертывания крови. Киев, 1957, с. 150—151. — 17. Балуда В. П., Ладатов А. Г., Пономарев Ю. Т. — «Бюлл. экспер. биол.», 1971, № 4, с. 109—111. — 18. Маркосян А. А. Физиология свертывания крови. М., 1966, с. 148—152. — 19. Бышевский А. Ш., Мухачева И. А. — «Вопр. мед. химии», 1975, № 4, с. 367—371.

Поступила 28/VI 1977 г.

#### EFFECT OF PHOSPHATIDYL SERINE ON FORMATION AND LYSIS OF FIBRIN

A. Sh. Byshevsky, T. M. Lapuseva, I. A. Mukhacheva

Chair of Biochemistry, Medical School, Tyumen

Phosphatidyl serine inhibited non-enzymatic step of fibrin formation (selfassociation of monomeric fibrin). But phosphatidyl serine did not affect the factor XIII activity, the rate of fibrin clot retraction and its tolerance to plasmin. Activity of plasmin was not altered in presence of phosphatidyl serine but influence of slowly acting antiplasmin on plasmin was slightly limited by the lipoid. Due to this phenomenon phosphatidyl serine caused the activation of fibrinolysis in native system (blood plasma). The data obtained support the earlier advanced assumptions on inhibition of thrombin-fibrinogene reaction by phcsphatidyl serine.

УДК 612.018:577.175.859.087.4

В. П. Зыкова, Е. В. Бочкарева, С. С. Владимиров, Т. Е. Беляева

#### ЭКСТРАКЦИЯ, РАЗДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ, ТРОМБОЦИТАХ И НЕКОТОРЫХ ТКАНЯХ

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Описаны модифицированные авторами методические приемы селективной органической экстракции и адсорбционно-распределительной колоночной хроматографии простагландинов, позволяющие выделить эти вещества с высоким выходом и дифференцировать их на серии А, Е и F. Приводятся данные, полученные радиоиммунологическим методом, о содержании простагландинов в плазме крови и тромбоцитах здоровых людей и больных ишемической болезнью сердца, а также о содержании этих веществ в плазме крови, жировой ткани и печени кроликов.

В последнее время внимание исследователей различных специальностей привлекают простагландины, обладающие высокой биологической активностью и широким спектром действия. В частности, простагландины принимают участие в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы как в норме, так и при патологии [1—3]. В связи с этим изучение качественного и количественного состава простагландинов у больных атеросклерозом представляет не только теоретический, но и практический интерес. Однако изучение простагландинов связано с некоторыми методическими трудностями, обусловленными в первую очередь тем, что простагландины присутствуют в тканях и биологических жидкостях в чрезвычайно низких концентрациях, порядка  $10^{-9}$ — $10^{-11}$  г, и, следовательно, для их определения требуются высокочувствительные и селективные методы. Кроме того, эти ве-

щества крайне лабильны, количественная оценка каждого из них возможна лишь при соблюдении определенных правил отбора и обработки материала, условий его хранения.

В связи с этим перед нами стояла задача подобрать оптимальные методические приемы, позволяющие с высокой степенью точности и хорошей воспроизводимостью экстрагировать простагландины из исследуемого материала, разделять их на группы и определять содержание каждого из них.

В литературе имеется ряд работ, посвященных методическим подходам к изучению простагландинов. На основании предварительного анализа каждого из них мы сочли возможным взять за основу для органической экстракции простагландинов метод [4]. Для хроматографического разделения этих веществ на индивидуальные серии мы использовали методы [5, 6]. Изменения, внесенные нами в выполнение каждого из указанных методов, подробно описаны ниже.

### Материалы и методы

Препараты меченных тритием  $^3\text{H}$  простагландинов групп  $\text{A}_1$ ,  $\text{E}_1$  и  $\text{F}_{2\alpha}$  с радиоактивностью 50—100 мкКи/мл фирмы «Amersham» (Англия). Коммерческие наборы для радиоиммунологического определения простагландинов  $\text{A}$ ,  $\text{E}$  и  $\text{F}_{2\alpha}$  фирмы «Clinical Assays», США. Кремниевая кислота «Красный химик», Ленинград. Сцинтилляционная жидкость следующего состава: 2,5-дифенилоксазол (ППО) — 4 г, 1,4-ди(5-фенил-2-оксазил)-бензол (ПОПОП) 200 мг, нафталин сублимированный 60 г, этанол 200 мл, диоксан сцинтилляционный 800 мл. Все органические растворители, кроме диоксана, были перегнаны.

#### *Органическая экстракция простагландинов*

*Обработка крови.* Кровь для исследования содержания простагландинов собирали патоцк между 8 и 10 ч утра из локтевой вены обычным способом в стеклянные пробирки, содержащие ЭДТА (1 мг/мл крови). Плазму отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 2000 g. Точно известное количество плазмы (обычно 1—2 мл) осаждали 4-кратным объемом смеси метанол — этанол (4 : 1; смесь А).

*Выделение тромбоцитов.* Для получения тромбоцитов 9 мл крови собирали в пробирку, содержащую 1 мл 3,8% раствора цитрата натрия. Эритроциты и лейкоциты отделяли центрифугированием 20 мин при 300—400 g. Плазму отсасывали и тромбоциты отделяли повторным центрифугированием 20 мин при 2000 g. Тромбоцитарную массу дважды промывали физиологическим раствором для удаления следов плазмы и разрушали ультразвуком при 35 кГц на аппарате УЗДН-1. К исходному объему добавляли 4-кратный объем смеси А.

*Обработка тканей.* При забое животных образцы тканей немедленно помещали в жидкий азот, после замораживания хранили при  $-20^\circ\text{C}$  не более 3—5 дней до начала обработки. Для определения простагландинов в жировой ткани и печени навеску ткани (1—2 г) гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в небольшом объеме смеси А. Гомогенат ткани количественно переносили в пробирку и доводили объем спиртовой смеси до 4-кратного соотношения (объем : вес). Все процедуры по обработке анализируемого материала проводили при  $2\text{--}4^\circ\text{C}$ . Осажденные спиртовой смесью пробы можно хранить при этой температуре до 10—15 дней [6].

В специальных опытах с целью отработки и выяснения эффективности методических приемов на всех этапах выделения и очистки простагландинов проводили количественную оценку выхода этих веществ, используя  $^3\text{H}$ -простагландины серий А, Е и F. Процедуры, использованные нами для очистки простагландинов из плазмы крови, тромбоцитов и гомогенатов тканей, а также результаты определения радиоактивности на каждом из этапов представлены на схеме.

Как видно из схемы, денатурированные белки после спиртового осаждения исследуемого образца отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 2000 g. Осадок дважды промывали 3—5 мл спиртовой смеси и повторно центрифугировали при том же режиме. Надосадки объединяли и переносили количественно в делительную воронку. Для очистки простагландинов от балластных липидов проводили двойную экстракцию этой спиртовой фракции двойным объемом петролейного эфира (т. кип.  $40\text{--}60^\circ\text{C}$ ), который затем отбрасывали. Спиртовую фракцию, полученную после очистки петролейным эфиром, подкисляли несколькими каплями 1 н.  $\text{HCl}$  до рН 4,3—4,5; контроль за значениями рН осуществляли с помощью рН-метра с микроэлектродами. Подкисленную фракцию экстрагировали двойным объемом хлороформа, в который переходят простагландины из спиртовой фракции, так как их  $K_d$  близка к указанным выше значениям рН. Для более полного количественного выхода простагландинов на этом этапе экстракцию хлороформом проводили дважды. Хлороформ-

ные экстракты объединяли и промывали двойным объемом дистиллированной воды для удаления следов соляной кислоты. Органическую фазу собирали и упаривали досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани 35—40°C.

#### Этапы выделения простагландинов и их выход на каждом этапе по радиоактивной метке

1. В анализируемый образец внесено 30 198 имп/мин (100%  $^3\text{H}$ -простагландина)  
↓
2. Осаждение пробы четырехкратным объемом смеси метанол — этанол (4 : 1); центрифугирование 20 мин при 2000 g; объединение супернатантов после двукратного промывания осадка спиртовой смесью — 29 876 имп/мин (99%)  
↓  
→ Осадок денатурированных белков отбрасывается
3. Двукратная экстракция спиртового супернатанта двойным объемом петролейного эфира — 29 813 имп/мин (99%)  
↓  
→ Петролейный эфир отбрасывается
4. Добавление 1 н. HCl до pH 4,3—4,5 и последующая двукратная экстракция хлороформом — 29 774 имп/мин (98,5%)  
↓  
→ Верхняя фаза отбрасывается
5. Промывание объединенных хлороформных экстрактов двойным объемом воды для удаления следов HCl — 28 133 имп/мин (93%)  
↓  
→ Водная фаза отбрасывается
6. Упаривание досуха органической фазы, содержащей простагландины, на ротационном испарителе  
↓
7. Колоночная хроматография простагландинов

Предлагаемая схема органической экстракции простагландинов позволяет получать их на последнем этапе с выходом до 93% от внесенной на первом этапе радиоактивной метки.

Как уже указывалось, за основу органической экстракции простагландинов был взят описанный в литературе [4] метод с внесенными нами модификациями, которые состоят в следующем: при осаждении белков плазмы крови или тканей анализируемых образцов мы применяли смесь метанол — этанол (4 : 1) с последующим двукратным промыванием денатурированных белков этой спиртовой смесью, что дало возможность резко увеличить (до 99%) выход простагландинов на данном этапе, в то время как в оригинальной методике [4] на этом этапе был использован этанол — менее полярный растворитель, не позволяющий полностью экстрагировать простагландины. На неудовлетворительную экстракцию простагландинов этанолом указывается также и в другой работе [7].

Кроме того, мы изменили pH среды с 3,0 до 4,3—4,5, так как ряд авторов показали, что значения pH менее 4,5 нежелательны при работе с простагландинами [6, 8], поскольку при более кислых значениях pH ухудшается хроматографическое разделение простагландинов, а также снижается их стабильность при хранении. Этот факт наблюдали в своей работе и мы. Для более полного удаления следов кислоты мы ввели дополнительную процедуру отмывки хлороформных экстрактов дистиллированной водой, что позволило улучшить разделение простагландинов при хроматографии их на кремниевой кислоте.

#### Колоночная хроматография простагландинов

Отработка условий для хроматографического разделения простагландинов на индивидуальные серии А, Е и F с помощью хроматографии на колонке с кремниевой кислотой представляла наибольшие трудности. Основными факторами, обеспечивающими стабильность получаемых результатов, при этом являются строго постоянное содержание воды, определенный размер частиц [9] и минимальное количество примесей других веществ в адсорбенте. Таким требованиям отвечают, например, кремниевая кислота «Mallinckrodt» и «Bio-Sil A» фирмы «Bio-Rad» (США). Среди отечественных коммерческих препаратов наилучшие результаты по разделению простагландинов на серии и стабильному выходу мы получили с препаратом водной кремниевой кислоты, чистой, ГОСТ 4214-70, Ленинградского завода «Красный химик».

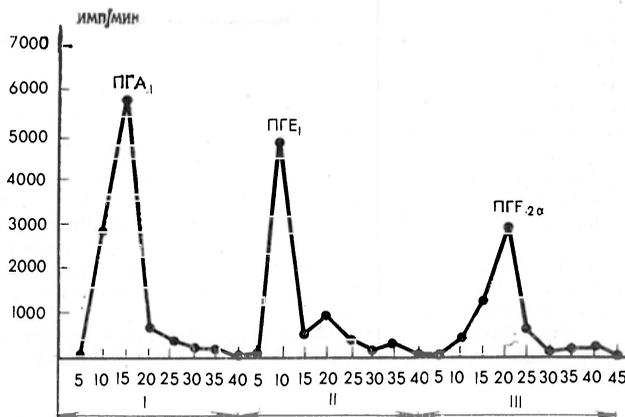
Хроматографическое разделение простагландинов проводили с использованием модифицированных методов [5, 6], авторы которых применяли мини-колонки с кремниевой кислотой, элюируя простагландины с адсорбента смесью бензол — этилацетат с добавлением метанола.

Однако при строгом воспроизведении этих методов мы не получили удовлетворительных результатов, что связано, вероятно, с более низкой адсорбционной способ-

ностью использованной нами кремниевой кислоты. В связи с этим мы увеличили количество адсорбента (с 0,5 до 1,5 г), объем элюирующих смесей и изменили порядок пропускания их через колонку, что позволило нам добиться хороших результатов с выходом 94—100% от количеств, внесенных на колонку простагландинов.

Профиль элюции смеси  $^3\text{H}$ -простагландинов (ПГ) при хроматографическом разделении на колонке с кремниевой кислотой.

Внесено 1 мл  $^3\text{H}$ -простагландин в смеси I ( $A_1$  — 9915 и имп/мин;  $E_1$  — 7427 имп/мин;  $F_{2\alpha}$  — 5472 имп/мин). Элюцию проводили ступенчато смесями I, II и III со скоростью 0,3 мл/мин. Выход составил для простагландина  $A_1$  — 100%, для  $E_1$  — 96%, для  $F_{2\alpha}$  — 94% внесенной радиоактивности.



**Подготовка кремниевой кислоты.** Кремниевую кислоту измельчали в фарфоровой ступне и просеивали через лабораторное сито № 3, позволяющее отделить частицы размером 100—200 меш. Подготовленную таким образом кислоту прокаливали при 110—120°C в течение 8—10 ч и хранили в банке с притертой пробкой в эксикаторе над прокаленным  $\text{CaCl}_2$  в течение 5—7 дней; при более длительном хранении кислоту повторно прокаливали при той же температуре в течение 2—3 ч.

**Элюирующие смеси органических растворителей.** Смесь I — бензол — этилацетат (6 : 4); смесь II — бензол — этилацетат — метанол (60 : 40 : 2), смесь III — бензол — этилацетат — метанол (6 : 4 : 2).

**Подготовка колонки.** Использовали стеклянные колонки размером 0,7×17 см с резервуаром для растворителя вместимостью 50 мл. В колонку вносили суспензию 1,5 г кремниевой кислоты в 3—5 мл смеси I и пропускали через колонку 10—15 мл этой смеси для уравнивания адсорбента. Одновременно готовили и параллельно проводили работу на 5—6 колонках.

**Внесение анализируемого образца в колонку.** Сухой экстракт простагландинов, полученный после органической экстракции, растворяли в минимальном объеме смеси I и количественно вносили в колонку в объеме не более 3 мл.

Для выбора оптимальных условий и контроля за хроматографическим разделением простагландинов в специальных опытах с  $^3\text{H}$ -простагландинами были отработаны условия их разделения на индивидуальные серии. Было найдено, что  $^3\text{H}$ -простагландин A элюируется с кремниевой кислотой 40 мл смеси I,  $^3\text{H}$ -простагландин E — тем же объемом смеси II, а  $^3\text{H}$ -простагландин  $F_{2\alpha}$  — 45 мл смеси III. Выход простагландинов каждой серии по радиоактивной метке колебался от 94 до 100% ( $n=37$ ) и не зависел от серии простагландина.

Профиль элюции одного из типичных опытов по разделению смеси  $^3\text{H}$ -простагландинов представлен на рисунке. Как видно, в указанных выше условиях происходит четкое разделение  $^3\text{H}$ -простагландинов на отдельные серии A, E и F с выходом 100, 96 и 94% соответственно.

На этом основании все дальнейшие опыты по хроматографическому разделению простагландинов анализируемых образцов проводили по описанной выше методике. Фракции, соответствующие простагландинам A, E и F полученные после хроматографии на колонке, упаривали досуха на ротационном испарителе, растворяли в хлороформе и количественно переносили в пробирку. Затем пробы упаривали досуха под азотом и хранили плотно закрытыми при  $-20^\circ\text{C}$  не более 10—15 дней до проведения радиоиммунологического анализа.

#### Радиоиммунологическое определение простагландинов

Принцип метода состоит в том, что антисыворотка, полученная к простагландинам конкретной группы, при ее добавлении к пробам, содержащим эти простагландины, специфически их связывает. Это связывание происходит в равной мере как с радиоактивными, так и с мечеными  $^3\text{H}$ -простагландинами, пропорционально их концентрации в пробе. Добавляя антисыворотку и  $^3\text{H}$ -простагландины к ряду последовательно разбавленных растворов с известной концентрацией немеченых стандартных

простагландинов в пробе, проводили реакцию связывания этих веществ антисывороткой. Для осаждения комплекса антител с простагландинами добавляли вторичные антитела. По величине радиоактивной метки в осадке рассчитывали процент связывания  $^3\text{H}$ -простагландинов антисывороткой для каждой известной концентрации немеченых простагландинов в пробе. На основании этих данных строили калибровочную кривую, откладывая на оси ординат процент связывания  $^3\text{H}$ -простагландина, а на оси абсцисс в логарифмическом масштабе количество немеченого простагландина, соответствующее определенному проценту связывания. Все расчеты процента связывания  $^3\text{H}$ -простагландина антисывороткой как для построения калибровочной кривой, так и в опытных пробах проводили за вычетом неспецифической сорбции метки реактивами, используемыми при постановке опыта (слепая проба), величина счета в ней не должна превышать 70—120 имп/мин.

Содержание простагландинов в исследуемых образцах плазмы крови и тканей определяли аналогичным образом: с заменой объема раствора стандартного простагландина на объем анализируемого образца. По величине процента связывания для этой пробы находили соответствующее ему количество простагландина по калибровочной кривой. Для точного расчета содержания простагландина в анализируемых пробах пользовались только линейной частью калибровочной кривой, соответствующей обычно 30—70% связывания; конечные результаты выражали в пикограммах на 1 мл крови или нанограммах на 1 г ткани.

Подробное описание радиониммунологического определения простагландинов дано в методическом руководстве фирмы «Clinical Assays», которое и было нами использовано для проведения этой части работы.

### Результаты и обсуждение

Прежде всего мы изучили содержание простагландинов в плазме крови 20 практически здоровых мужчин и сопоставили полученные результаты с данными других исследователей (табл. 1).

Как видно из табл. 1, найденное нами содержание простагландинов А, Е и F в плазме крови здоровых людей согласуется с результатами, полученными другими авторами [5, 10], что дает основание считать методы, модифицированные нами, адекватными и специфичными.

На основании этих апробированных методических приемов было определено содержание простагландинов в тромбоцитах больных ишемической болезнью сердца (ИБС). Результаты этих определений представлены в табл. 2.

Анализируя полученные данные, необходимо отметить прежде всего выявленное нами снижение содержания простагландина Е в тромбоцитах у больных ИБС по сравнению с содержанием этого простагландина у здоровых людей ( $P < 0,01$ ). Количество простагландинов А и F в обеих группах обследованных лиц при этом существенно не различалось. Уменьшение содержания простагландина Е, обладающего способностью тормозить агрегацию тромбоцитов, начального этапа тромбообразования, вероятно, может приводить к интенсификации этого процесса у больных ИБС. Это предположение подтверждается также и тем, что у больных ИБС нарушено количественное соотношение между содержанием простагландина Е — ингибитора агрегации и простагландина F — активатора этого процесса: у здоровых людей оно равно 1,63, а у больных — 0,99 (см. табл. 2).

Можно предполагать, что изменение скорости образования простагландина Е в тромбоцитах больных ИБС приводит к дисбалансу в содержании простагландинов, обладающих разнонаправленным влиянием на функциональное состояние тромбоцитов, что может явиться одной из причин гиперагрегации у этих больных.

Можно предполагать, что изменение скорости образования простагландина Е в тромбоцитах больных ИБС приводит к дисбалансу в содержании простагландинов, обладающих разнонаправленным влиянием на функциональное состояние тромбоцитов, что может явиться одной из причин гиперагрегации у этих больных.

Таблица 1

Содержание простагландинов (в пг/мл) в плазме крови здоровых мужчин

Источник	Простагландины		
	А	Е	F
[10]	—	570—1200	140—950
[5]	1024—214	378±73	84±15
Собственные данные [11]	1007±70	912±82,5	494±40,6

Известно также, что простагландин Е обладает способностью расширять сосуды, а простагландин F — сужать их. В связи с этим количественное изменение в содержании простагландинов этих двух групп в тромбоцитах больных ИБС может играть роль в регуляции сосудистого тонуса и артериального давления, так как тромбоциты являются одним из источников поступления простагландинов в циркуляцию.

Нами изучено также содержание простагландинов в плазме крови, жировой ткани и печени кроликов, так как эти животные часто используются в модельных опытах для изучения роли гиперхолестеринемии в развитии атеросклероза. Исследование было проведено на 6 кроликах-самцах породы шиншилла массой тела 2,5—3 кг, находившихся на обычном пищевом режиме. Найдено, что содержание простагландинов А и Е в плазме кроликов составило  $794 \pm 127$  и  $933 \pm 326$  нг/мл соответственно. Содержание простагландинов этих же серий в жировой ткани было равно  $3,77 \pm 1,73$  нг/г для простагландина А и  $3,38 \pm 1,55$  нг/г для простагландина Е. Количество простагландинов А и Е в печени равно  $7,53 \pm 3,40$  и  $2,85 \pm 0,35$  нг/г соответственно.

Таблица 2

Исследуемый материал	Простагландин			
	А	Е	F	Е/F
Тромбоциты здоровых людей (n=20)	$64,7 \pm 11,8$	$134 \pm 13,6$	$81,8 \pm 13,0$	1,63
Тромбоциты больных ИБС (n=53)	$50,7 \pm 4,73$	$86,0 \pm 6,25$	$86,9 \pm 7,99$	0,99

$P < 0,01$

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Higgins C. B., Braunwald E. — Am. J. Med., 1972, v. 53, p. 92—112.
2. Samuelsson B. — Ann. Rev. Biochem., 1975, v. 44, p. 669—695.
3. Weeks J. R. — Circulat. Res., 1969, v. 24, N 5, Suppl. 1, p. 123.
4. Ungger W. G., Stamford J. F., Bennett A. — Nature, 1971, v. 233, p. 336—337.
5. Jaffe B. M., Behrman H. R., Parker C. W. — J. Clin. Invest., 1973, v. 52, p. 338.
6. Caldwell B. V., Speroff L., Brock W. A. et al. The Prostaglandins. Clinical Applications in Human Reproduction Ed. E. M. Southern. New York, 1972, p. 257.
7. Holmes S. W., Horton E. W., Stewart M. J. — Life Sci., 1968, v. 7, Pt 11, p. 349.
8. Valenzuela G., Harper M. J. K. — Prostaglandins, 1976, v. 12, p. 377—381.
9. Valenzuela G., Antonini R. — Ibid., v. 11, p. 769—771.
10. Inagawa T., Ohki S., Sawada N. et al. — Yakugaku Zasshi, 1972, v. 92, p. 1187—1197.
11. Зыкова В. П., Афоина И. П., Задоя А. А. — Кардиология, 1976, № 2, с. 68—73.

Поступила 30/VI 1977 г.

#### EXTRACTION, SEPARATION AND QUANTITATIVE ESTIMATION OF PROSTGLANDINES IN BLOOD PLASMA, THROMBOCYTES AND IN SOME TISSUES

V. P. Zyкова, E. V. Bochkareva, S. S. Vladimirov, T. E. Belyaeva

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

Modified methods, using selective organic extraction and absorption-distributional column chromatography, are described for isolation of prostglandines with high yield; the substances were differentiated by means of the methods used into series A, E, F. Use of radioimmunologic method enabled to obtain data on content of prostglandines in blood plasma and in thrombocytes of healthy people and of patients with ischemic heart impairments as well as on content of these substances in rabbit blood plasma, fatty and livery tissues.

Б. А. Кудряшов, Ю. А. Пытель, Г. М. Баскакова, Л. А. Ляпина,  
И. И. Чакалева

## ВЛИЯНИЕ ГЕПАРИНА НА КОНЦЕНТРАЦИЮ САХАРА КРОВИ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

Кафедра физиологии человека и животных МГУ им. М. В. Ломоносова и кафедра урологии  
I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова

*Аллоксан вызывает у животных развитие диабета и угнетение функции противосвертывающей системы крови. При одновременном применении аллоксана и гепарина диабет или не развивался или же возникшая гипергликемия к концу эксперимента резко уменьшалась, при этом функция противосвертывающей системы сохранялась.*

В последние годы появились сведения о применении гепарина в комплексном лечении больных сахарным диабетом, особенно при сосудистых осложнениях [1, 2]. Однако данные о гипогликемическом эффекте гепарина у больных сахарным диабетом и здоровых людей разноречивы [3—6] и посвящены выявлению кратковременного действия гепарина на концентрацию сахара в крови [7, 8]. Малочисленны и противоречивы данные о действии гепарина при экспериментальном диабете у животных [9, 10].

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния гепарина на концентрацию сахара крови и состояние функции противосвертывающей системы в условиях хронического опыта при аллоксановом диабете у крыс.

### М е т о д и к а

Опыты были проведены на белых крысах-самцах весом 180—200 г. В I серии экспериментов (40 крыс) диабет вызывали подкожным введением аллоксана однократно в дозе 40 мг/200 г животного. Во II серии опытов (40 крыс) одновременно с аллоксаном и затем 1 раз в день в течение 2 нед вводили гепарин по 100 ЕД/200 г. В III серии экспериментов гепарин начинали вводить через 48 ч после инъекции аллоксана на фоне уже возникшей гипергликемии, используя те же дозы этих веществ, что в I и II сериях экспериментов.

IV и V серии были контрольными: в IV серии крысам ежедневно в течение 2 нед внутримышечно вводили гепарин в дозе 100 ЕД/200 г, а в V серии — подкожно 0,5 мл физиологического раствора NaCl.

Гепарин и аллоксан растворяли в физиологическом растворе NaCl и вводили по 0,5 мл этого раствора в стерильных условиях. Кровь для исследования у животных всех серий брали до введения препарата (фон) и затем через 2, иногда 3, 7 и 14 дней после начала эксперимента в количестве 1,5 мл с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1.

Концентрацию сахара в крови определяли колориметрическим методом с использованием серно-тимолового реактива [11]. В бестромбоцитарной плазме крови определяли ее суммарную фибринолитическую активность (СФА), ферментативный фибринолиз (НФ), осуществляемый комплексными соединениями гепарина с белками крови и аминами, по методу Кудряшова и Ляпиной [12] на пластинах нестабилизированного фибрина, приготовленных по методу Кудряшова и соавт. [13].

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

У 40 крыс I серии опытов фоновые колебания концентрации сахара в крови до введения аллоксана составляли 110—120 мг/100 мл со средним значением  $117,3 \pm 4,6$  мг/100 мл. В этих условиях СФА составляла  $37,8—39,8$  мм<sup>2</sup>, НФ плазмы —  $10,8—13$  мм<sup>2</sup>, причем доля НФ от СФА составляла 29—32%. Через 2 сут после введения аллоксана погибло 50% животных. При вскрытии у погибших крыс было обнаружено большое количество мелких и крупных тромбов в органах, преимущественно в легких.

Через 2 сут после введения аллоксана у всех 20 крыс, оставшихся в живых, повысилась концентрация сахара в крови и снизился уровень НФ плазмы до  $6,5$  мм<sup>2</sup>, или до 15—19%. По степени возникшей гипергликемии и последующему течению диабета этих животных можно было разделить на

3 группы. Как видно из табл. 1, у 8 крыс развился диабет в легкой форме, что характеризовалось развитием гипергликемии, не превышающей 200 мг/100 мл ( $169 \pm 3,5$  и  $160 \pm 8,5$  мг/100 мл через 2 и 3 сут соответственно). У 5 крыс уровень сахара превышал 200 мг/100 мл, но был ниже 300 мг/100 мл ( $238 \pm 31,3$  мг/100 мл) — это форма диабета средней тяжести. И у 7 животных развилась тяжелая форма диабета с гипергликемией, которая через 2 сут достигла  $289 \pm 27,4$  мг/100 мл и продолжала увеличиваться в течение всех 2 нед эксперимента.

Возникшая через 2 дня после введения аллоксана гипергликемия носила стойкий характер и сохранялась в течение последующих 14 дней эксперимента. Такой же стойкий характер носило и изменение НФ плазмы крови: в течение последующих 14 дней НФ составлял  $5,4-6,0$  мм<sup>2</sup> и его доля в СФА занимала 20% (табл. 2). При легкой форме диабета концентрация сахара в крови через 7 и 14 дней ( $233 \pm 28,0$  и  $207 \pm 28,0$  мг/100 мл соответственно). При тяжелой форме диабета наблюдалось постепенное и довольно значительное возрастание концентрации сахара в крови к концу опыта (до  $330 \pm 17,3$  мг/100 мл).

Во II серии экспериментов, в которой животным одновременно с аллоксаном в течение последующих 2 нед ежедневно вводили гепарин, через 2 сут от начала опыта из 40 крыс погибло 4 (10%). Фоновое содержание сахара крови для крыс данной серии

Таблица 1  
Влияние гепарина на концентрацию глюкозы в крови при аллоксановом диабете у крыс

Исследуемое вещество	Число животных в опыте	Число погибших животных	Форма диабета	Концентрация глюкозы, мг/100 мл в разные сроки наблюдения (в сут)						
				фон	2	P	7	P	14	P
Аллоксан	40	20 (50%)	Диабет легкий (8) Диабет средней тяжести (5)	$118 \pm 2,1$	$169 \pm 5,5$	< 0,001	$177 \pm 14,1$	< 0,01	$191 \pm 24,9$	< 0,01
Аллоксан + гепарин	40	4 (10%)	Диабет тяжелой (7)	$111 \pm 8,6$	$238 \pm 31,5$	< 0,05	$233 \pm 28,0$	< 0,01	$207 \pm 28,0$	< 0,05
			Диабет не развился (16)	$110 \pm 8,9$	$289 \pm 27,4$	< 0,001	$308 \pm 26,7$	< 0,001	$330 \pm 17,3$	< 0,001
			Диабет легкий (9) Диабет средней тяжести (11)	$117 \pm 4,5$	$129 \pm 4,7$	< 0,05	$113 \pm 2,2$	> 0,05	$122 \pm 8,6$	> 0,05
Аллоксан и гепарин через 48 ч	24	12 (50%)	Диабет легкой (9) Диабет средней тяжести (11)	$124 \pm 4,6$	$170 \pm 6,7$	< 0,001	$146 \pm 4,5$	> 0,05	$122 \pm 10,2$	> 0,05
Гепарин (контроль) Физиологический раствор (контроль)	6	—	Диабет средней тяжести	$122 \pm 6,4$	$283 \pm 13,6$	< 0,001	$198 \pm 24,5$	< 0,0	$119 \pm 5,8$	> 0,05
			—	$118 \pm 3,1$	$228 \pm 4,9$	< 0,001	$170 \pm 8,1$	< 0,001	$127 \pm 12,2$	> 0,05
Физиологический раствор (контроль)	6	—	—	$126 \pm 8,2$	$137 \pm 4,9$	> 0,05	$120 \pm 1,9$	> 0,05	$116 \pm 1,0$	> 0,05
Физиологический раствор (контроль)	6	—	—	$117 \pm 6,7$	$121 \pm 3,6$	> 0,05	$112 \pm 9,1$	> 0,05	$123 \pm 4,7$	> 0,05

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно фона. В скобках указано количество животных.

Т а б л и ц а 2

Суммарная фибринолитическая активность (СФА), неферментативный фибринолиз (НФ) плазмы крови животных, получивших аллоксан в дозе 40 мг/200 г (в мм<sup>2</sup>)

Условия опыта	Статистический показатель	После введения аллоксана									
		До опыта		через 48 ч		через 72 ч		через 7 дней		через 14 дней	
		СФА	НФ	СФА	НФ	СФА	НФ	СФА	НФ	СФА	НФ
Аллоксан	$M \pm m$	$38,8 \pm 1,3$	$11,1 \pm 0,7$	$34,4 \pm 2,4$	$6,5 \pm 1,4$	$27,0 \pm 2,7$	$5,4 \pm 1,0$	$26,1 \pm 2,8$	$3,3 \pm 0,7$	$29,9 \pm 2,0$	$6,0 \pm 1,5$
	$n$ $P$ % НФ	30 28,6 30	30 28,6 30	7 <0,05 39,0 ± 1,8	7 <0,001 10,0 ± 1,1	13 <0,001 37,2 ± 1,2	13 <0,001 23	13 <0,01 9,4 ± 0,6	14 <0,01 34,5 ± 1,9	14 <0,01 9,8 ± 0,7	11 <0,01 37,9 ± 2,2
Аллоксан + гепарин (100 ME)	$M \pm m$	$38,8 \pm 1,0$	$10,8 \pm 0,9$	$39,0 \pm 1,8$	$10,0 \pm 1,1$	$37,2 \pm 1,2$	$9,4 \pm 0,6$	$34,5 \pm 1,9$	$9,8 \pm 0,7$	$37,9 \pm 2,2$	$9,1 \pm 1,1$
	$n$ $P$ % НФ	30 29 24	30 29 24	11 >0,5 27,6 ± 0,9	11 >0,5 4,2 ± 1,7	23 >0,5 29,6 ± 1,6	23 >0,5 11	23 >0,5 6,5 ± 0,7	18 >0,5 29,4 ± 1,6	18 >0,5 6,8 ± 1,4	11 >0,5 30,8 ± 3,3
Введены аллоксан и через 48 ч гепарин (100 ME)	$M \pm m$	$37,8 \pm 1,5$	$10,9 \pm 0,6$	$27,6 \pm 0,9$	$4,2 \pm 1,7$	$29,6 \pm 1,6$	$6,5 \pm 0,7$	$29,4 \pm 1,6$	$6,8 \pm 1,4$	$30,8 \pm 3,3$	$10,8 \pm 2,3$
	$n$ $P$ % НФ	24 28 28	24 28 28	5 <0,001 15,2	5 <0,001 15,2	11 <0,001 15,2	11 <0,001 21,2	11 <0,01 21,2	7 <0,02 22,9	5 >0,5 35,0	5 >0,5 35,0

П р и м е ч а н и е. Статистические показатели рассчитаны относительно исходного уровня (до опыта).

было равно  $120 \pm 1,8$  мг/100 мл. Через 2 сут было обнаружено, что у 16 животных (40%) диабет не развился и концентрация сахара крови колебалась в пределах исходного уровня (крайние границы —  $113 \pm 2,2$  и  $129 \pm 4,7$  мг/100 мл,  $P > 0,05$ ). У 9 животных было отмечено повышение концентрации сахара крови через 2 сут до  $170 \pm 6,7$  мг/100 мл с последующим возвращением к фоновому уровню: через неделю еще не наблюдалась незначительная гипергликемия ( $146 \pm 4,5$  мг/100 мл), но разница между значениями на 2-й и 7-й дни была недостоверна, а через 14 дней содержание сахара в крови стало нормальным ( $122 \pm 10,3$  мг/100 мл). У 11 крыс этой серии через 2 сут был выявлен диабет средней тяжести: концентрация сахара в крови равна  $283 \pm 13,6$  мг/100 мл. Но и в этой группе уже через 7 дней гипергликемия резко уменьшилась (до  $198 \pm 24,5$  мг/100 мл), а через 14 дней концентрация сахара в крови достигла исходного уровня ( $119 \pm 5,8$  мг/100 мл). Тяжелая форма диабета, наблюдаемая в I серии экспериментов, во II серии нами не обнаружена.

СФА и НФ плазмы крови во II серии экспериментов практически не менялись на протяжении всего времени проведения опыта, доля НФ от СФА составляла 24—28%.

В III, как и в I, серии опытов, через 2 сут после введения аллоксана погибло 50% животных. У оставшихся в живых крыс развился диабет средней тяжести, и уровень сахара крови превышал 200 мг/100 мл ( $228 \pm 1,9$  мг/100 мл), при этом доля НФ плазмы крови снизилась с 28 до 15,2% или с 10,9 до 4,2 мм<sup>2</sup>. В этой серии гепарин начали вводить с третьих суток на фоне уже воз-

никшей гипергликемии. На 8-й день после начала эксперимента и через 5 дней после введения гепарина произошло уменьшение концентрации сахара в крови до  $170 \pm 8,1$  мг/100 мл и через 14 дней — до нормы ( $127 \pm \pm 2,2$  мг/100 мл). В этой серии опытов уже через 72 ч после начала эксперимента доля НФ повысилась и стала достигать 21,2% от СФА, а к 14-му дню эксперимента уже составляла 35%.

В IV и V сериях, которые являлись контрольными, крысам вводили гепарин и физиологический раствор NaCl соответственно. Обнаружено, что в обеих контрольных сериях в течение 2 нед эксперимента концентрация сахара в крови колебалась в пределах нормы и различия между полученными величинами были недостоверны.

На основании проведенного эксперимента можно заключить, что аллоксан в использованных дозах вызывает у животных развитие диабета и угнетение функции противосвертывающей системы ПСС, что выражалось в снижении неферментативного фибринолиза плазмы по сравнению с исходным уровнем. При одновременном применении аллоксана и гепарина диабет или не развивался, или же возникающая гипергликемия к концу эксперимента резко уменьшалась. При этом функция ПСС не нарушалась. В условиях применения гепарина через 48 ч после введения аллоксана, т. е. на фоне возникшей гипергликемии, уже через 5 дней с начала применения гепарина наблюдалось уменьшение содержания сахара в крови и повышение неферментативного фибринолиза в плазме до нормального уровня.

Таким образом, применение гепарина при аллоксановом диабете у подопытных животных сопровождалось положительной корреляцией между сохранением или восстановлением функции противосвертывающей системы и снижением концентрации сахара крови. Последнее, по-видимому, обусловлено защитой части  $\beta$ -клеток поджелудочной железы гепарином или его производными от действия аллоксана, возникающими в организме.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалев И. Е., Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д. — В кн.: Физиология, биохимия, фармакология и клиническое применение гепарина. М., 1968, с. 112. — 2. Лесничий А. В. — «Тер. арх.», 1968, № 6, с. 108. — 3. Троппер М. С. — В кн.: Вопросы физиологии и патологии гепарина. Новосибирск, 1965, с. 197. — 4. Эйдеман Г. Р. — В кн.: Материалы конференции по физиологии, биохимии, фармакологии и клиническому применению гепарина. М., 1965, с. 121. — 5. Эйдеман Г. Р. — В кн.: Физиология, биохимия, фармакология и клиническое применение гепарина. М., 1968, с. 285. — 6. Vagbanov G. — «Scripta sci. med.», 1975, v. 12, p. 83. — 7. Бозаджиева Е., Върбанов Г. — «Пробл. эндокринолог.», 1966, № 12, с. 45. — 8. Бозаджиева Е., Огнянов М., Георгиева Сл. и др. — «Пробл. вѣтр. мед.», 1973, № 1, с. 125. — 9. Цыганов Э. П., Трумие Т. Е. — В кн.: Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. М., 1975, с. 197. — 10. Еремينا И. И., Калашников В. М. — «Научн. труды Челябинск. обл. клин. больницы», 1967, сб. № 5, с. 55. — 11. Берестов В. А. Биохимия и морфология крови пушных зверей. Петрозаводск, 1971, с. 219. — 12. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. — «Лабор. дело», 1971, № 6, с. 326. — 13. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Баскова И. П. — «Вестн. Московск. ун-та. Сер. биол.», 1974, № 5, с. 41.

Поступила 22/VI 1977 г.

#### EFFECT OF HEPARIN ON CONCENTRATION OF BLOOD SUGAR IN ALLOXAN DIABETES IN RATS

*B. A. Kudryashov, Yu. A. Pytel, G. M. Baskakova, L. A. Lyapina, I. I. Chekalova*

Chair of Human and Animal Physiology, M. V. Lomonosov State University, Chair of Urology, I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

Administration of alloxan caused development of diabetes in animals and inhibited the anticoagulation system of blood. Simultaneous or successive treatment with alloxan and heparin did not cause development of diabetes. Under these conditions the developing hyperglycemia was distinctly decreased and the functions of the anticoagulation system were maintained at the normal level.

О. Б. Карпова, Е. Л. Бухова, Н. Ф. Аврова и Е. И. Шварц

СОДЕРЖАНИЕ И СОСТАВ ГАНГЛИОЗИДОВ МОЗГА  
ПРИ БОЛЕЗНИ ДАУНА

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР и Лаборатория медицинской генетики АМН СССР, Ленинград

*При болезни Дауна содержание ганглиозидов — характерных компонентов плазматических мембран нервных клеток — понижено в сером веществе мозга и повышено в белом. По всей вероятности, это свидетельствует о задержке дифференциации нейронов при болезни Дауна. В составе ганглиозидов серого и белого веществ мозга в норме преобладает дисило-ганглиозид  $G_{D1a}$ , велико также содержание  $G_{M1}$ ,  $G_{T1}$  и  $G_{D1b}$ . Сколько-нибудь значительных изменений в составе ганглиозидов мозга у больных по сравнению с контролем не обнаружено.*

Хромосомные болезни занимают большой удельный вес в структуре причин умственной отсталости (по данным Лаборатории медицинской генетики АМН СССР, в нашей стране насчитывается около 1 млн. таких больных). Болезнь Дауна, в основе которой лежит трисомия по 21 паре хромосом, является одной из наиболее распространенных хромосомных аномалий. Несмотря на интенсивные поиски первичных биохимических звеньев, обуславливающих развитие заболевания, эта проблема до настоящего времени еще далека от разрешения. Поскольку ведущим клиническим симптомом болезни Дауна является олигофрения, то представляется актуальным детальное изучение биохимических характеристик ткани головного мозга, в том числе его липидного состава [1]. Работ по изучению ганглиозидов головного мозга при хромосомном дисбалансе (трисомиях) в литературе нам не встретилось.

Ганглиозиды представляют собой гликолипиды, содержащие сиаловые кислоты. В литературе описан целый ряд наследственных заболеваний, вызванных нарушением синтеза определенных ферментов катаболизма ганглиозидов (болезнь Тея—Сакса,  $G_{M1}$ -ганглиозидов и некоторые другие). Для этих болезней, ведущими симптомами которых является психомоторная дегенерация и идиотия, характерно резкое изменение содержания и состава ганглиозидов [2]. Ганглиозиды локализованы преимущественно в плазматических мембранах нервных клеток. Их содержание является ценным критерием для количественной характеристики синаптических аксо-дендритических контактов и степени разветвленности нейронов [3].

Целью настоящей работы является изучение содержания и состава ганглиозидов белого и серого вещества головного мозга при болезни Дауна.

## М е т о д и к а

Исследовали белое и серое вещество лобной доли больших полушарий больных болезнью Дауна *post mortem* (4 случая). Диагноз был установлен клинически и подтвержден исследованием кариотипа. В контрольной группе изучали мозг детей, умерших от заболеваний, не связанных с поражением ЦНС. По возможности для исследований подбирали случаи, при которых причиной смерти явились однопипные поражения.

Ганглиозиды выделяли из ткани мозга по методу Фолча и соавт. [4]. Дополнительную экстракцию ганглиозидов проводили по Сузуки [5]. Экстракт ганглиозидов диализовали против дистиллированной воды в течение 5—6 сут, упаривали на ротационном испарителе при 30—35°C, растворяли в смеси хлороформ — метанол 1 : 1, фильтровали через обезжиренный бумажный фильтр, вновь упаривали и определяли содержание сиаловой кислоты ганглиозидов по реакции с резорцином [6]. Разделение ганглиозидов на фракции, гетерогенные по углеводному компоненту, проводили методом восходящей тонкослойной хроматографии на отечественном силикагеле марки КСК. В качестве растворителя использовали смесь хлороформ — метанол — 2,5 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (60 : 35 : 8). Содержание отдельных фракций ганглиозидов определяли количественно [6].

## Результаты и обсуждение

Практически вся сиаловая кислота в мозге представлена N-ацетилнейраминовой кислотой (N-АНК). Количественное содержание N-АНК ганглиозидов в сером и белом веществе мозга больных болезнью Дауна и контрольной группы показано в табл. 1. В контрольной группе содержание ганглиозидов в сером веществе составляет 850—870 мкг сиаловой кислоты на 1 г влажной ткани, при болезни Дауна оно снижено до 650—790 мкг/г. Ганглиозиды являются характерными компонентами нервных клеток. Существует точка зрения, что содержание ганглиозидов является более адекватным критерием для количественной оценки массы плазматических мембран

Т а б л и ц а 1

Содержание ганглиозидов в мозге больных болезнью Дауна и в контрольной группе, мкг на 1 г влажной ткани

Ткань мозга	Болезнь Дауна			Контроль		
	возраст ребенка					
	4 мес	6 мес	10 лет	1 год	1½ года	9 лет
Серое вещество (кора мозга)	700	650	790	853	870	875
Белое вещество	536	538	59	301	353	128

нервных клеток по сравнению с существующими гистохимическими методами [3]. Содержание ганглиозидов в головном мозге человека возрастает главным образом в пренатальный период развития и в первые недели после рождения [7]. Более низкое содержание ганглиозидов в коре мозга больных можно рассматривать как отвечающее более ранним стадиям онтогенеза в норме и свидетельствующее о задержке дифференцировки нейронов при болезни Дауна. Эти данные согласуются с морфологическими изменениями, обнаруженными при этом заболевании [8].

Содержание ганглиозидов в белом веществе мозга здоровых детей 1—1½ лет составляет 300—350 мкг сиаловой кислоты ганглиозидов на 1 г влажной ткани, тогда как в мозге 9-летнего здорового ребенка оно равняется 130 мкг/г. У одного из детей, больных болезнью Дауна (возраст 10 лет), содержание ганглиозидов в белом веществе мозга составляло 59 мкг сиаловой кислоты ганглиозидов на 1 г влажной ткани, что значительно ниже, чем в мозге здорового ребенка того же возраста и взрослого человека. В настоящее время мы не можем объяснить, чем вызвано столь низкое содержание ганглиозидов в белом веществе этого ребенка. У двух других больных детей (4 и 6 мес) в белом веществе было обнаружено более высокое содержание ганглиозидов (535—540 мкг/г), чем в контроле (300—350 мкг/г). Содержание ганглиозидов в белом веществе новорожденных выше, чем у детей более старшего возраста. С 4—6-месячного возраста оно стабилизируется [9]. Более высокое содержание ганглиозидов в белом веществе мозга новорожденных можно связать с малой степенью миелинизации мозга (для миелина характерно очень низкое содержание ганглиозидов). Таким образом, эти данные также согласуются со сведениями о меньшей дифференцированности клеточных элементов нервной ткани при болезни Дауна.

Из представленных в табл. 2 и 3 данных видно, что ни в белом, ни в сером веществе при болезни Дауна не обнаружено сколько-нибудь значительных изменений в составе ганглиозидов. Основным ганглиозидом серого и белого вещества мозга человека всех возрастных групп является  $G_{D1a}$ . Значительные количества сиаловой кислоты ганглиозидов приходится также на долю  $G_{M1}$ ,  $G_{T1}$ ,  $G_{D1b}$ . Содержание ганглиозидов  $G_{D2}$ ,  $G_{M2}$ ,  $G_{D3}$  и  $G_Q$  значительно ниже. В ткани мозга 10-летнего больного болезнью Дауна

содержание  $G_{D1a}$  было очень низким, а содержание  $G_{D1b}$ , напротив, более высоким, чем у других больных этой болезнью или в контрольной группе.

Для многих заболеваний, связанных с поражением ЦНС, характерно увеличение содержания ганглиозидов с укороченной углеводной цепью, которые являются минорными фракциями  $G_{D2}$ ,  $G_{D3}$ ,  $G_{M2}$ ,  $G_{M3}$ . Эти изменения связывают с демиелинизацией и глиозисом. Однако подобное изменение состава ганглиозидов не является, по-видимому, характерным для болезни Дауна и наблюдалось лишь в одном из четырех случаев.

Т а б л и ц а 2

Состав ганглиозидов в сером веществе головного мозга больных болезнью Дауна и детей контрольной группы (% N-АНК ганглиозидов)

Фракция	Серое вещество головного мозга						
	болезнь Дауна				контроль		
	возраст ребенка						
	4 мес	5 мес	6 мес	10 лет	1 год	1 1/2 года	9 лет
$G_Q$	0,9	0,3	0,9	2,7	1,4	0,9	1,9
$G_{T1}$	11,2	11,8	9,3	14,6	9,7	11,3	14,6
$G_{D1b}$	7,9	7,8	9,6	20,0	7,3	7,9	14,5
$G_{D2}$	5,0	5,2	8,3	6,1	4,7	3,6	4,0
$G_{D1a}$	56,1	49,2	41,8	34,7	52,6	54,6	44,9
$G_{D3}$	0,7	—	2,6	1,0	1,9	1,3	1,3
$G_{M1}$	16,2	23,4	20,6	19,5	18,4	17,5	16,8
$G_{M2}$	2,0	2,3	6,9	1,4	4,0	3,0	2,0

Уменьшение относительного содержания  $G_{D1a}$  и увеличение содержания  $G_{D1b}$  с возрастом наблюдаются в сером и белом веществе мозга детей контрольной группы и при болезни Дауна. Полученные результаты согласуются с данными других авторов об изменении состава ганглиозидов головного мозга человека в ходе постнатального онтогенеза [10]. В белом веществе мозга детей контрольной группы было отмечено увеличение содержания

Т а б л и ц а 3

Состав ганглиозидов в белом веществе головного мозга больных болезнью Дауна и детей контрольной группы (% N-АНК ганглиозидов)

Фракция	Белое вещество головного мозга						
	болезнь Дауна				контроль		
	возраст ребенка						
	4 мес	5 мес	6 мес	10 лет	1 год	1 1/2 года	9 лет
$G_Q$	0,9	1,3	0,7	4,4	2,0	2,0	1,1
$G_{T1}$	10,7	18,6	8,4	23,4	12,0	10,1	8,5
$G_{D1b}$	8,7	13,1	6,7	19,4	10,7	11,2	9,4
$G_{D2}$	4,9	5,7	7,4	8,6	8,2	7,8	7,1
$G_{D1a}$	55,3	45,5	49,5	27,6	49,3	41,1	42,8
$G_{D3}$	0,6	—	2,5	1,0	2,7	1,5	3,3
$G_{M1}$	17,0	14,6	23,5	13,1	13,8	24,0	26,0
$G_{M2}$	1,9	1,2	4,1	2,5	1,3	2,0	1,8

фракции  $G_{M1}$  с возрастом. Так, у годовалого ребенка на долю  $G_{M1}$  приходилось 13,8% от суммарной сиаловой кислоты ганглиозидов, тогда как у детей старшего возраста его содержание составляло 18,5—26% и было выше, чем в сером веществе.  $G_{M1}$  является преобладающим ганглиозидом в миелине, где на его долю приходится 60—80% сиаловой кислоты ганглиозидов [11]. Увеличение концентрации  $G_{M1}$  в белом веществе мозга с возрастом

связано, по-видимому, с процессом миелинизации, которая в основном заканчивается к 2 годам [12].

Имеются указания, что ганглиозиды, входящие в состав плазматических мембран, по всей вероятности, непосредственно участвуют в связывании интерферона и необходимы для осуществления его действия на клетки [13]. Методом соматической гибридизации удалось закартировать на 21 хромосоме генетические детерминанты рецепторов интерферона. Так, получение соматических гибридов фибропластов мыши, содержащих 21 хромосому человека, делает клетки чувствительными к интерферону человека [14]. Показано семикратное повышение чувствительности трисомных клеток к действию интерферона по сравнению с диплоидными культурами [15]. Если допустить, что в формировании рецепторов интерферона участвуют определенные фракции ганглиозидов, то можно было бы ожидать значительных изменений в их относительном содержании при трисомии. Однако нами не выявлено заметных различий в составе ганглиозидов нервной ткани больных болезнью Дауна и детей контрольной группы.

В заключение следует отметить, что изучение 4 случаев больных болезнью Дауна выявило снижение содержания ганглиозидов в сером веществе мозга больных, что может свидетельствовать о задержке дифференцировки нейронов при этом заболевании. Данные о содержании ганглиозидов в белом веществе мозга больных болезнью Дауна также согласуются с морфологической картиной, наблюдаемой при указанном заболевании.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Stephens M. C., Menkes J. H. — *Develop. Med. Child Neurol.*, 1969, v. 2, p. 346. — 2. Volk B. W. — In: *The Gangliosidosis*. Ed. B. W. Volk, L. Schiek. London, 1975, p. 135. — 3. Hess H. H., Bass N. H., Thalheimer C. et al. — *J. Neurochem.*, 1976, v. 26, p. 1115. — 4. Folch — Pi J., Lees M., Sloane — Stanley G. H. — *J. biol. Chem.*, 1957, v. 226, p. 497. — 5. Suzuki K. — *J. Neurochem.*, 1965, v. 12, p. 969. — 6. Svennerholm L. — *Ibid.*, 1963, v. 10, p. 613. — 7. Vanier M. T., Holm M., Ohman R. et al. — *Ibid.*, 1971, v. 18, p. 581. — 8. Ивановская Т. Е., Цинзерлинг А. В. *Патологическая анатомия*. М., 1976, с. 358. — 9. Svennerholm L., Vanier M. T. — *Brain Res.*, 1972, v. 47, p. 457—468. — 10. Suzuki K. — *J. Neurochem.*, 1965, v. 12, p. 969. — 11. Аврова Н. Ф., Ченукаева Е. Ю., Обухова Е. Л. — *Ibid.*, 1974, v. 20, p. 997. — 12. Филимонов И. Н. — В кн.: *Многотомное руководство по неврологии*. М., 1960, т. 1, кн. 1, с. 61. — 13. Vengris V. E., Reynolds F. H., Hollenberg M. D. et al. — *Virology*, 1976, v. 72, p. 486. — 14. Revel M., Bash D., Ruddle F. H. — *Nature*, 1976, v. 260, p. 139. — 15. Tan W. H., Telthfield T., Ruddle F. H. — *J. exp. Med.*, 1973, v. 137, p. 317.

Поступила 26/VII 1977 г.

#### CONTENT AND COMPOSITION OF BRAIN GANGLIOSIDES FROM PATIENTS WITH MONGOLISM

*O. B. Karpova, E. L. Obukhova, N. F. Avrova, E. I. Shwartz*

I. M. Sechenov Institute of Evolutional Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Laboratory of Medical Genetics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Content and composition of gangliosides were studied in brain white and grey substances of patients with mongolism. Content of gangliosides, which are typical components of plasmatic membranes of nervous cells, was decreased in brain grey substance of the patients as compared with control group, whereas content of the lipids was increased in white substance. Differentiation of neurones appears to be inhibited in mongolism. Content of disialoganglioside  $GD_2a$  exceeded the content of other gangliosides in brain white and grey substances in normal state; content of  $GM_1$ ,  $GT_1$ ,  $GD_2b$  was also increased. Composition of gangliosides from brain of the patients with not distinctly altered as compared with that of children of control group.

М. Н. Перцева, З. П. Желудкова, Л. А. Кузнецова

## О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ $\alpha$ ГМФ И $\alpha$ АМФ В ИХ ВЛИЯНИИ НА УГЛЕВОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ МЫШЦ

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

*Исследовали влияние различных концентраций  $\alpha$ ГМФ на эффекты  $\alpha$ АМФ в скелетных мышцах кур. Обнаружено, что  $\alpha$ ГМФ ( $10^{-3}$ — $10^{-7}$  М), сам по себе не влияя на активность фосфорилазы и гликогенсинтетазы мышц, полностью снимает влияние на них  $\alpha$ АМФ. Этот блокирующий эффект специфичен как для  $\alpha$ ГМФ, так и для  $\alpha$ АМФ. Рассмотрены возможные механизмы указанного эффекта  $\alpha$ ГМФ: 1) усиление гидролиза  $\alpha$ АМФ, 2) антагонизм на уровне протеинкиназной системы. Показано, что  $\alpha$ ГМФ ( $10^{-3}$ — $10^{-6}$  М) не стимулирует активность фосфодиэстеразы при миллимолярной концентрации субстрата —  $\alpha$ АМФ.*

Как установлено, в организме животных наряду с циклическим аденозинмонофосфатом ( $\alpha$ АМФ) присутствует и циклический гуанозинмонофосфат ( $\alpha$ ГМФ). Однако содержание его в большинстве тканей на 1—2 порядка ниже, чем  $\alpha$ АМФ [1].

Если биологическая роль  $\alpha$ АМФ как посредника действия гормонов и универсального регулятора многообразных процессов в клетке изучена довольно обстоятельно, то функции  $\alpha$ ГМФ только начинают исследоваться. Обнаружено, что  $\alpha$ ГМФ влияет на многие процессы, которые регулируются  $\alpha$ АМФ: на липолиз в жировой ткани, гликогенолиз и глюконеогенез в печени, биосинтез инсулина и др. [2—5]. Однако характер этого действия зависит от концентрации  $\alpha$ ГМФ. При высоких ее значениях ( $10^{-3}$ — $10^{-4}$  М) в ряде случаев наблюдается сходный с действием  $\alpha$ АМФ эффект, но выражен он значительно слабее [1, 6]. При применении концентраций, близких к физиологическим, часто возникают эффекты, противоположные действию  $\alpha$ АМФ [1, 7].

Антагонизм между этими нуклеотидами обнаруживается и в других аспектах. Так, в условиях действия некоторых гормонов возникают противоположно направленные изменения их содержания: катехоламины, в частности, снижают содержание  $\alpha$ ГМФ и увеличивают количество  $\alpha$ АМФ в сердечной мышце [8].

При совместном применении холинергических агентов, обычно увеличивающих содержание  $\alpha$ ГМФ в тканях, и адренергических, приводящих к накоплению  $\alpha$ АМФ, исчезают эффекты, опосредуемые через  $\alpha$ АМФ, и проявляются влияния, реализуемые через  $\alpha$ ГМФ [9, 10].

Модулятор активности протеинкиназ при использовании определенных ее субстратов стимулирует фермент, зависимый от  $\alpha$ ГМФ, и, напротив, ингибирует зависимый от  $\alpha$ АМФ [11, 12]. Установлена реципрокность в развитии указанных протеинкиназ в некоторых тканях в ходе онтогенеза [13].

Основываясь на имеющихся фактах, Гольдберг предложил концепцию 2 универсальных клеточных регуляторов с противоположно направленным действием [1]. Внутриклеточная концентрация циклических АМФ и ГМФ в некоторых процессах взаимосвязана и изменяется противоположно. Такие взаимоотношения наблюдаются в двунаправленных антагонистических системах подобно сокращению — расслаблению сердечной мышцы, клеточному росту — дифференциации, синтезу — распаду гликогена и т. п. [7, 8, 14, 15].

Учитывая важную биологическую роль циклических нуклеотидов и возможность взаимного их контроля как основы регуляции разнообразных клеточных процессов и функций, мы предприняли настоящее исследование по изучению влияния  $\alpha$ АМФ,  $\alpha$ ГМФ и их совместного действия на активность ключевых ферментов распада и синтеза гликогена — фосфорилазы (КФ 2.4.1.1) и гликогенсинтетазы (КФ 2.4.1.11) мышечной ткани на различных стадиях онтогенетического развития. Наряду с этим исследовали фермент рас-

пада циклических нуклеотидов — фосфодиэстеразу (КФ 3.1.4.17), ее способность гидролизовать цАМФ, цГМФ и их взаимные влияния.

### Методика

Объектом служили скелетные мышцы (мышцы ног) куриных эмбрионов и цыплят породы русская белая. Активность фосфорилазы (формы а) определяли в гомогенате мышечной ткани модифицированным методом Кори, описанным нами ранее [16]. Гликогенсинтетазу (независимая от глюкозо-6-фосфата — форма I) исследовали в экстракте мышц (800 g) спектрофотометрическим способом, в основу которого положен метод Барбера и соавт. [17, 18].

Активность фосфодиэстеразы определяли методом Ченга [19] с некоторыми изменениями, внесенными нами применительно к нашему объекту. Состав инкубационной среды (конечная концентрация): 0,5 мМ цАМФ, 0,1 мМ  $MnCl_2$ , 80 мМ трис-НСl рН 8,45 (этот же буфер использовали для гомогенизации ткани), экстракт мышц (800 g), 100 мкг/мл яда средиземноморской эфы в качестве источника 5'-нуклеотидазы. Инкубацию проводили в течение 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали 55% трихлоруксусной кислотой. В безбелковом фильтрате определяли неорганический фосфат амидольным методом, представляющим собой микромодификацию метода Фиске — Суббароу [20].

### Результаты и обсуждение

Как показано нами ранее, цАМФ снижает активность гликогенсинтетазы I и увеличивает уровень фосфорилазы а в скелетных мышцах цыплят. Эти эффекты отсутствуют в эмбриональном периоде и появляются в ходе раз-

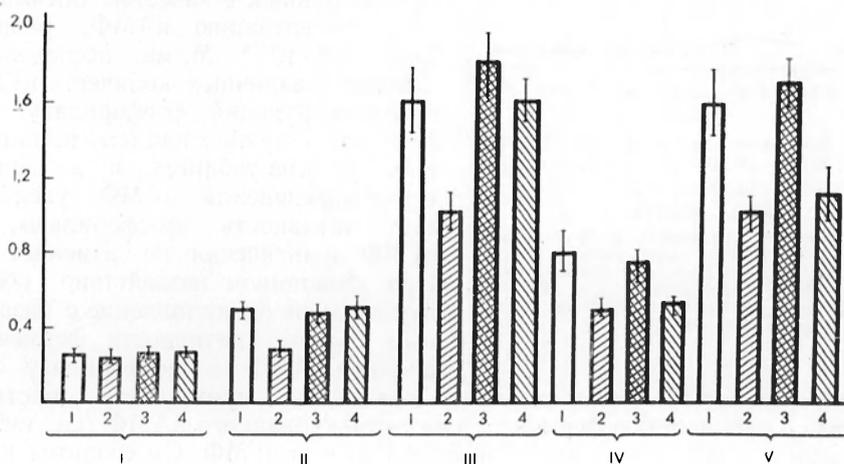


Рис. 1. Влияние цГМФ и ГМФ на эффекты цАМФ и кальция в отношении гликогенсинтетазы I скелетных мышц куриных эмбрионов и цыплят.

По вертикали: активность гликогенсинтетазы в микролях НАД на 1 г сырой ткани в 1 мин; по горизонтали: I — 13-дневные эмбрионы: 1 — здесь и в последующих группах — контроль; 2 — цАМФ ( $5 \cdot 10^{-4}$  М); 3 — цГМФ ( $1 \cdot 10^{-4}$  М); 4 — цАМФ + цГМФ; II — 18-дневные эмбрионы: 1—4 — то же, что в I (цГМФ —  $1 \cdot 10^{-8}$  М); III — 15-дневные цыплята: 1—4 — то же, что в I (цГМФ —  $1 \cdot 10^{-7}$  М); IV — 2-дневные цыплята: 2 —  $CaCl_2$  ( $5 \cdot 10^{-3}$  М); 3 — цГМФ ( $1 \cdot 10^{-4}$  М); 4 —  $CaCl_2$  + цГМФ; V — 15-дневные цыплята: 2 — цАМФ ( $5 \cdot 10^{-4}$  М); 3 — ГМФ ( $5 \cdot 10^{-4}$  М); 4 — цАМФ + ГМФ. I и 2 в II, III, IV, V —  $P < 0,05$ .

вития только перед вылуплением [18, 21]. Согласно нашим представлениям, отсутствие указанных эффектов цАМФ в эмбриональной мышце связано с состоянием самих ферментов углеводного обмена, которые в этот период, по-видимому, еще полностью не сформированы. Протеинкиназная реакция не является лимитирующим звеном в данном процессе, поскольку уже на эмбриональных стадиях фермент обладает высокой активностью и отчетливо стимулируется цАМФ [22, 23].

Как следует из рис. 1, у 13-дневных эмбрионов цАМФ [1, 2] не изменяет активность гликогенсинтетазы, на 18-й день развития (II) и у цыплят (III) активность фермента статистически достоверно понижается. цГМФ в широком диапазоне концентраций (от  $10^{-4}$  до  $10^{-7}$  М) не влияет на актив-

ность гликогенсинтетазы ни в эмбриональный, ни в постэмбриональный период развития (I, II, III—3). При сочетанном применении обоих нуклеотидов эффект цАМФ полностью исчезает (II, III—4). Существенно, что блокирующее действие цГМФ на эффекты цАМФ проявляется при низких его концентрациях ( $10^{-7}$  М), лежащих в пределах физиологических. Это действие, по-видимому, специфично по отношению к эффектам цАМФ, поскольку эффект другого агента — ионов кальция, который также снижает активность гликогенсинтетазы в мышцах, не снимается цГМФ (I, IV—2, 4). Специфичен этот эффект и в отношении самого цГМФ, так как нециклический аналог нуклеотида — ГМФ — не блокирует влияния цАМФ (I, V—2, 4).

Аналогичное исследование проведено нами на фосфорилазной системе мышц. цАМФ в зоне концентраций от  $5 \cdot 10^{-4}$  до  $5 \cdot 10^{-6}$  М отчетливо активирует фосфорилазную систему, приводя к увеличению активности формы *a* фермента (рис. 2). Это согласуется с

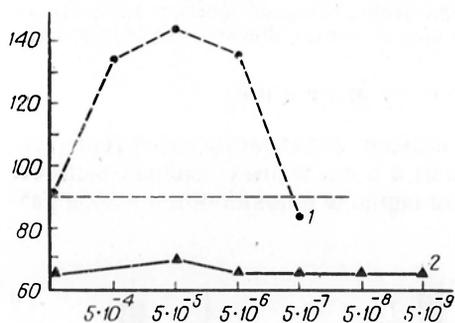


Рис. 2. Влияние различных концентраций цАМФ и цГМФ на активность фосфорилазы *a* скелетных мышц 1-месячных цыплят.

По вертикали: активность фосфорилазы в мкмольях НФ на 100 мг сырой ткани в 15 мин; по горизонтали: концентрация нуклеотидов в молях: цАМФ (1) и цГМФ (2). Все определения проведены на одном гомогенате мышц, полученных от 5 цыплят.

данными по исследованию фосфорилазы тканей млекопитающих [24]. При концентрации  $5 \cdot 10^{-7}$  М влияние цАМФ не обнаруживается. цГМФ в концентрации от  $5 \cdot 10^{-5}$  до  $5 \cdot 10^{-9}$  М не оказывает сам по себе какого-либо влияния на активность фосфорилазы (см. рис. 2). Выбрав на основе полученных данных в качестве оптимальной концентрацию цАМФ, равную  $5 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-6}$  М, мы исследовали действие различных количеств цГМФ на активирующей фосфорилазу эффект этого нуклеотида (см. таблицу). Как видно из таблицы, и в данной серии определений цАМФ увеличивает активность фосфорилазы, а цГМФ практически не изменяет ее. При сочетанном воздействии обоих нуклеотидов (сопоставление с базальным уровнем активности фермента) влияние цАМФ на фосфорилазу полностью снимается. Если же эти данные по суммарному действию сравнить с активностью фермента, уже активированного цАМФ (см. таблицу, графы 3 и 10), можно оценить эффект самого цГМФ. Он сводится к отчетливому снижению активности фосфорилазы, т. е. к эффекту, противоположному по знаку действию цАМФ, но близкому в количественном отношении. Сходные результаты получены в других исследованиях [9], которые показали, что ацетилхолин, увеличивающий содержание цГМФ в сердечной мышце, только тогда влияет на фосфорилазу, когда она предварительно активирована адреналином (цАМФ). Результат этого совместного действия выражается в эффекте, противоположном влиянию адреналина (цАМФ), — в снижении активности фосфорилазы *a*. Все эти данные согласуются с литературными данными, свидетельствующими, что цГМФ оказывает регулирующее влияние на различные клеточные процессы только тогда, когда они предварительно изменены цАМФ [7, 10].

Механизм, на котором могут основываться антагонистические взаимоотношения между цАМФ и цГМФ, не известен. Высказано несколько предположений, в частности, что цГМФ может блокировать эффекты цАМФ за счет усиления его гидролиза, стимулируя фосфодиэстеразу и тем снижая действующую концентрацию цАМФ. С целью проверки этого предположения были проведены следующие эксперименты. Определяли активность фосфодиэстеразы на различных субстратах. Показано, что фермент гидролизует в концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  М 3', 5'-АМФ, 3', 5'-ГМФ и не обнаруживает актив-



рующее действие низких концентраций цГМФ на распад микромолярных количеств цАМФ [26, 27]. В то же время есть указания, что цГМФ не влияет на скорость гидролиза цАМФ в мозговой ткани крысы [28, 29] или даже понижает ее [30].

Против фосфодиэстеразного механизма блокирующего эффекта цГМФ свидетельствуют, по нашему мнению, следующие соображения. Это действие проявляется не только в условиях *in vivo* с эндогеннообразованными, но и с экзогенными циклическими нуклеотидами *in vitro* (как в наших опытах),

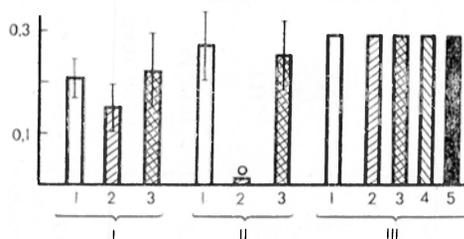


Рис. 3. Гидролиз цАМФ фосфодиэстеразой скелетных мышц 4—6-дневных цыплят в присутствии различных концентраций цГМФ.

По вертикали: активность фосфодиэстеразы в мкмоль НФ на 1 г сырой ткани в 1 мин. По горизонтали: I, 1 — здесь и в последующих группах — цАМФ ( $5 \cdot 10^{-4}$  М); 2 — цГМФ ( $5 \cdot 10^{-4}$  М); 3 — цАМФ + цГМФ; III, 1 — цАМФ ( $5 \cdot 10^{-4}$  М) и 2 — 5 — в присутствии 10, 5, 2,5; 1, 25 · 10<sup>-6</sup> М цГМФ; I и II — каждая величина — среднее из определений на 5 цыплятах; III — средние определения на одном экстракте, полученном из мышц 5 цыплят.

добавляемыми в концентрациях, значительно превышающих физиологические. Вряд ли фосфодиэстераза, работающая при микромолярных концентрациях субстрата, даже если она стимулирована цГМФ, способна так снизить содержание цАМФ, чтобы это сказалось на его эффектах.

Некоторые авторы приходят к выводу об отсутствии влияния цГМФ на уровень цАМФ в клетке, основываясь на данных о неизменности содержания цАМФ в условиях, сопровождающихся накоплением цГМФ [1, 6, 9].

Второе предположение говорит о том, что взаимодействие между цАМФ и цГМФ определяется на уровне цАМФ-зависимой протеинкиназы [1, 14]. В пользу этого

свидетельствуют данные о подавлении активирующего действия цАМФ на протеинкиназу скелетных мышц [31]. Интересны в этом отношении факты, показывающие, что цГМФ ( $10^{-8}$ — $10^{-10}$  М) значительно (на 20—30%) ингибирует связывание цАМФ протеинкиназой скелетных мышц и стимулирует высвобождение уже связанного <sup>3</sup>H-цАМФ из комплекса с регуляторной субъединицей этого фермента [1]. Между тем есть сведения и другого характера. В опытах некоторых авторов цГМФ не препятствовал реализации действия цАМФ на протеинкиназу скелетных и сердечной мышц, их действие было аддитивным [32, 33]. В этой связи следует подчеркнуть, что протеинкиназа мышц, хотя и активируется обоими нуклеотидами, обладает значительно большим сродством к цАМФ ( $K_a = 0,067$  мкМ), чем к цГМФ ( $K_a = 9,9$  мкМ) [32]. Основываясь на этих фактах, трудно объяснить антагонистические отношения между циклическими нуклеотидами на уровне регуляторной субъединицы протеинкиназы. В-третьих, можно предположить, что антагонизм возникает между цАМФ и цГМФ-зависимыми протеинкиназами на уровне их субстратов (в нашем случае — фосфорилазы и гликогенсинтазы). Есть указания, что цГМФ-протеинкиназа способна фосфорилировать киназу фосфорилазы б [12]. Все приведенные предположения требуют экспериментальной проверки.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о существовании определенной взаимосвязи между цАМФ и цГМФ в их влиянии на углеводный метаболизм скелетных мышц. Существенно, что блокирующее влияние цГМФ специфично и проявляется при концентрациях, близких к физиологическим. Взаимодействия подобного рода могут составлять динамическую основу регуляции различных клеточных процессов и функций с помощью антагонистических систем типа адренергической и холинергической [9, 10, 34].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Goldberg N. D., O'Dea R. F., Haddox M. K. — «Advanc. Cycl. Nucl. Res.», 1973, v. 3, p. 155. — 2. Murad P., Manganiello V., Vaughan M. — «J. biol. Chem.», 1970, v. 245, p. 3352. — 3. Heldergerman J. G., Wilson D. E., Levine R. A. — «Arch. int. Pharmacodyn.», 1972, v. 199, p. 389. — 4. Himmis-Hagen J. — In.: Catecholamines. New York, 1972, p. 363. — 5. Howell S. L., Montague W. — «Biochem. J.», 1974, v. 142, p. 379. — 6. Epton J. H., Hardman J. G., Williams T. F. et al. — «J. biol. Chem.», 1971, v. 246, p. 2658. — 7. McMahon D. — «Science», 1974, v. 185, p. 1012. — 8. Kolata G. B. — Ibid., 1973, v. 182, p. 149. — 9. Watanabe A. M., Besch H. R. — «Circulat. Res.», 1975, v. 37, p. 309. — 10. Gardner R. M., Allen D. O. — «J. Pharmacol. exp. Ther.», 1976, v. 198, p. 412. — 11. Donnelly T. E., Kuo J. F., Reues P. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1973, v. 248, p. 190. — 12. Kuo J. F. — «Metabolism», 1975, v. 24, p. 321. — 13. Idem. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1975, v. 72, p. 2256. — 14. Юдаев Н. А., Афиногенова С. А., Покровский Б. В. и др. — «Успехи совр. биол.», 1975, т. 8, с. 351. — 15. Там же, 1976, т. 80, с. 34. — 16. Желудкова З. П. — В кн.: Ферменты в эволюции животных. Л., 1969, с. 103. — 17. Varber A. L., Orrell S. A., Bueding J. E. — «J. biol. Chem.», 1967, v. 242, p. 4040. — 18. Кузнецова Л. А., Перцева М. Н. — «Ж. эволюц. биохим.», 1974, т. 10, с. 440. — 19. Cheung W. J. — «Biochim. biophys. Acta», 1969, v. 191, p. 303. — 20. Doose H. — «Z. ges. exp. Med.», 1959, Bd 131, S. 646. — 21. Перцева М. Н., Желудкова З. П. — «Докл. АН СССР», 1969, т. 189, с. 1157. — 22. Zalin R. J., Montague W. — «Exp. Cell. Res.», 1975, v. 93, p. 55. — 23. Novak E., Drummond G. I., Skala J. et al. — «Arch. Biochem.», 1972, v. 150, p. 511. — 24. Sutherland E. W., Rall T. W. — «Pharmacol. Rev.», 1960, v. 12, p. 265. — 25. Nair K. G. — «Biochemistry (Wash.)», 1966, v. 5, p. 150. — 26. Beavo J. A., Hardman J. G., Sutherland E. W. — «J. biol. Chem.», 1971, v. 246, p. 3841. — 27. Russell T. R., Pastan I. H. — Ibid., 1974, v. 249, p. 7764. — 28. Brooker G., Thomas L. J., Appleman M. M. — «Biochemistry (Wash.)», 1968, v. 7, p. 4177. — 29. O'Dea R. F., Haddox M. K., Goldberg N. D. — «Fed. Proc.», 1970, v. 29, Abstr. 473. — 30. Weiss B., Fertel R., Figlin R. et al. — «Molec. Pharmacol.», 1974, v. 10, p. 615. — 31. Schultz G., Hardman J. G., Schultz K. et al. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1973, v. 70, p. 3389. — 32. Schlender K. K., Weiss H., Villar-Palasi C. — «Biochim. biophys. Acta», 1969, v. 191, p. 272. — 33. Gray H. L., Gray R. R., Olsson R. A. — «J. biol. Chem.», 1973, v. 248, p. 1496. — 34. Wollenberger A., Krause E. G. — In.: International Congress on Pharmacology. 5th. Proceedings. V. 5, New York, 1973, p. 170.

[Поступила 27/VII 1977 г.]

### ON THE INTERACTION OF cGMP AND cAMP AND THEIR EFFECT ON CARBOHYDRATE METABOLISM IN MUSCLES

*M. N. Pertseva, Z. P. Zheludkova, L. A. Kuznetsova*

I. M. Sechenov Institute of Evolutional Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Leningrad

cGMP ( $10^{-4}$ - $10^{-7}$  M) did not affect the activity of phosphorylase and glycogen synthetase from chicken skeletal muscles; but the cGMP prevented completely an effect of cAMP on the enzymes. This blocking effect was specific for cGMP (GMP did not exhibit the effect) and for cAMP (influence of calcium on the enzyme was not eliminated by cAMP). Possible mechanisms of the cGMP effects studied are considered: 1) stimulation of cAMP hydrolysis, 2) antagonism at the level of protein kinase system. cGMP ( $10^{-4}$ - $10^{-7}$  M) did not stimulate the phosphodiesterase activity at millimolar concentration of its substrate — cAMP.

УДК 616.36-006.092.9-008.9

*В. Н. Гобеев, Л. В. Хрипач, Т. Т. Березов*

### НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕЧЕНИ ВЫСОКО-И НИЗКОРАКОВЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ И ПЕРВИЧНЫХ СПОНТАННЫХ ГЕПАТОМ

Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

*Изучены половые различия в частоте развития спонтанных опухолей печени у мышей линии СВА, количестве белка митохондрий, активности цитохромоксидазы (ЦО), глюкокиназы (ГЛК) и гекокиназы (ГК), а также субклеточное распределение последней в первич-*

ных гепатомах и нормальной печени мышей СВА и СЗНА. Показано, что у самцов мышей линии СВА опухоли печени возникают в 7 раз чаще, чем у самок. В первичных спонтанных гепатомах активность ГК, ГЛК, ЦО и количество митохондрий существенно изменены, как и в перевиваемых штаммах. Однако в отличие от последних в спонтанных гепатомах отсутствует связанная с митохондриями ГК. У самцов СВА уже на ранних стадиях жизни отмечается снижение активности ГЛК и ЦО по сравнению с таковой у самок СВА и самцов СЗНА, т. е. наблюдается значительное снижение активности функциональных параметров печени. Введение мышам СЗНА под кожу спины пилюль с о-аминоазотолуолом уже в ранние сроки вызывает в печени весь комплекс изменений активности указанных выше ферментов, который характерен для гепатом.

В последние годы при изучении процессов малигнизации, злокачественного роста и поиске противоопухолевых препаратов в основном используют различные штаммы перевиваемых новообразований, в частности гепатомы с разной скоростью роста [1, 2]. Ранее было показано, что в разных штаммах перевиваемых мышинных гепатом некоторые свойства ключевого фермента утилизации углеводов — гексокиназы (ГК) — резко отличаются от свойств этого фермента как в печени взрослых животных и в регенерирующей печени [3], так и в печени эмбрионов и нормальных тканях другого гистогенеза [4]. Выяснено также, что между активностью и субклеточным распределением ГК, количеством митохондрий и скоростью роста разных перевиваемых гепатом существует линейная корреляция [5, 6]. Неясно, однако, являются ли данные закономерности справедливыми также для первичных гепатом или же эти свойства ГК и цитохромоксидазы (ЦО) представляют собой следствие длительного пассирования опухолей и сопутствующей прогрессии. В настоящей работе делается попытка экспериментального решения этих вопросов.

#### М е т о д и к а

Работу по изучению спонтанных гепатом проводили на мышах линии СВА (подштамм Т<sub>6</sub>Т<sub>6</sub>) обоего пола и разного возраста — от 1½ мес до 2 лет. Опыты по действию канцерогена на печень проводили на мышах линии СЗНА. В качестве гепатоканцерогена использовали о-аминоазотолуол (о-ААТ), который вводили мышам под кожу спины 1 раз в месяц в виде пилюль массой около 10 мг. Часть животных была нам любезно предоставлена В. И. Гельштейн, которая рекомендовала данный способ введения канцерогена. Контрольным животным делали аналогичную операцию, но без введения канцерогена. Всех животных содержали на обычном рационе вивария.

Активность ЦО определяли по окислению восстановленного цитохрома с согласно методике Куперстейна и Лазарова [7] и выражали во всех опытах в единицах оптической плотности на 1 мг белка за 1 мин ( $\Delta E/\text{мг белка}/\text{мин}$ ). ГК определяли по восстановлению НАДФ при помощи экзогенной глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы по методике Итона [8]. Активность ГЛК и глюкокиназы (ГЛК) во всех опытах выражена в мкмольх НАДФ·Н<sub>2</sub> на 1 мг белка безъядерного гомогената в час. Активность ГЛК определяли при концентрации глюкозы 1 мМ, а ГЛК — 100 мМ.

Белок определяли биуретовым методом по Гоа [9] с небольшими модификациями. В печени и гепатомах мышей линии СВА содержится очень большое количество липидов. Поэтому использование в качестве растворителя 3% NaOH и обычной схемы измерения экстинкции приводит к большому завышению результатов определения белка из-за мутности проб. Чтобы свести до минимума эти ошибки, определение белка проводили следующим способом: к 0,1 мл суспензии ткани добавляли 3,9 мл раствора, содержащего в 10 л. КОН 1% (по массе) тритона X-100 и 1% (по массе) дезоксихолата натрия; после тщательного перемешивания пробы инкубировали 4—5 ч при комнатной температуре до исчезновения мутности и после этого в одну из параллельных пробирок с белком добавляли 0,2 мл раствора CuSO<sub>4</sub> (опыт), а в другую 0,2 мл H<sub>2</sub>O (контроль); через 15—20 мин измеряли экстинкцию обеих проб при 330 нм на спектрофотометре СФ-16 соответственно против раствора, содержащего 4 мл растворителя с 0,2 мл реактива CuSO<sub>4</sub> или 0,2 мл H<sub>2</sub>O. По величине  $\Delta E = (E_{\text{опт}} - E_{\text{контроль}})$  вычисляли количество белка в 0,1 мл взятого образца, используя формулу Гоа:  $P = (3,45 \cdot \Delta E - 0,07)$ . Предлагаемая модификация определения белка позволяет получать хорошо воспроизводимые результаты в самых различных биологических материалах.

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

У мышей линии СВА существуют четкие половые различия в частоте встречаемости опухолей печени. У 70% (у 33 из 47) самцов 1,8—2-летнего возраста обнаруживаются большие опухоли печени, причем у большинства

мышей выявляются множественные новообразования во всех долях печени. У самок этого же возраста опухоли печени встречаются только у 10% (у 6 из 58), при этом они преимущественно одиночные и небольших размеров.

Поскольку ранее нами было показано, что в разных штаммах перевиваемых мышинных гепатом, в том числе и в высококодифференцированной гепатоме 49, значительная часть ГК прочно связана с мембранами митохондрий, было интересно исследовать субклеточное распределение этого фермента в первичных спонтанных опухолях печени. Данные этого исследования представлены в табл. 1. Видно, что ни в самой ткани опухоли, ни в «нормальных» не пораженных опухолью участках печени не обнаруживается связанная митохондриями ГК. Это означает, что по данному признаку первичные гепатомы сохраняют свойства исходной нормальной печеночной ткани. Хорошо известно, что в различных нормальных тканях взрослых крыс большая часть ГК связана с мембранами митохондрий [4, 10], а в

печени вся ГК представлена только растворимой фракцией [4]. В отличие от печени взрослых животных печень эмбрионов и новорожденных крыс [11] и мышей [3, 12] в основном содержит связанную форму ГК. Представленные в табл. 1 данные показывают, что при малигнизации гепатоцитов появление эмбриональных черт по рассматриваемому признаку не обязательно. В этой связи интересно отметить, что по нашим предварительным данным в сыворотке мышей со спонтанными гепатомами не удается обнаружить и  $\alpha$ -фетопротейн. По-видимому, можно заключить, что появление обоих этих эмбриональных свойств непосредственно не связано с малигнизацией гепатоцитов и они являются отдаленными следствиями последующей прогрессии гепатом.

Из табл. 1 видно также, что активность ГК в гепатомах значительно выше, чем в печени опухоленосителей. Это было исследовано более подробно. Одновременно была измерена активность ЦО и ГЛК в тех же опухолях, поскольку известно, что в перевиваемых гепатомах активность этих ферментов резко уменьшена [6, 13]. Полученные данные суммированы в табл. 2. Видно, что в гепатомах активность ГК в 3 раза выше, чем в печени здоровых мышей СВА того же возраста и в печени опухоленосителей, а активность ЦО уменьшается соответственно в 2,1—2,3 раза и достигает активности в перевиваемых гепатомах [6]. Наиболее четкое различие между печеню и гепатомами обнаруживается при сравнении отношения ГК/ЦО для соответствующих тканей. Различий в данной величине у контрольных животных и опухоленосителей нет, а в гепатомах это отношение увеличено в 7 раз.

По активности ГЛК между опытными и контрольными тканями печени не удалось выявить существенных различий; во всех случаях, однако, эта активность низкая.

Поскольку в частоте возникновения гепатом отмечаются существенные различия в зависимости от пола, представляло интерес сравнить активность рассматриваемых ферментов в печени самок и самцов мышей СВА разного возраста, а также в печени мышей низкораковой линии СЗНА. Эти данные также представлены в табл. 2. Видно, что по активности ГК все исследованные группы животных достоверно не отличаются друг от друга. По активности ЦО самки СВА и мыши СЗНА не отличались друг от друга, а в печени самцов СВА активность оказалась несколько ниже, чем у предыдущих. Наиболее существенные различия выявляются, однако, между рассматри-

Таблица 1  
Субклеточное распределение ГК в первичных спонтанных гепатомах мышей (по данным 4 опытов)

Ткань	Активность ГК, мкмоль НАДФ · Н <sub>2</sub> на 1 мг белка за 1 ч		
	гомогенат	супернатант	осадок
Печень	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,01	—0,02
Гепатома	0,28 ± 0,05	0,26 ± 0,03	+0,02

ваемыми группами мышей в активности ГЛК — специфического печеночного фермента, тесно связанного с нормальной физиологией этого органа. Уже у 1½-месячных самцов СВА активность ГЛК значительно ниже, чем в печени самок того же возраста и 7-месячных самцов СЗНА, а в печени 7-месячных самцов СВА активность ГЛК снижается до уровня активности в печени старых животных и гепатомах.

Т а б л и ц а 2

Активность ГК, ГЛК и ЦО в спонтанных гепатомах и в печени мышей самцов и самок разного возраста линии СВА и печени мышей с гепатомами

Ткань	ГК	ГЛК	ЦО	ГК/ЦО
Печень здоровых крыс (n=5)	0,10±0,03	0,40±0,1	2,3±0,2	0,04
Печень опухоленосителей (n=11)	0,10±0,02	0,40±0,15	2,5±0,2	0,04
Гепатомы (n=11)	0,30±0,03	0,30±0,06	1,1±0,3	0,27
Печень самок 1½ мес (n=5)	0,14±0,02	0,7±0,15	3,7±0,1	0,04
Печень самцов 1½ мес (n=5)	0,13±0,03	0,5±0,10	3,1±0,1	0,04
Печень самок 7 мес (n=5)	0,15±0,03	0,6±0,10	3,7±0,1	0,04
Печень самцов 7 мес (n=5)	0,10±0,02	0,30±0,10	3,2±0,1	0,03
Печень самцов СЗНА 7 мес (n=5)	0,14±0,03	0,85±0,15	3,9±0,2	0,03

П р и м е ч а н и е. В скобках число животных в опыте. Здесь и в табл. 4. Активность ГК и ГЛК измеряли соответственно при концентрации глюкозы 1 и 100 мМ и выражены в мкмольях на 1 мг белка в час, активность ЦО — в ΔЕ на 1 мг белка за 1 мин.

Сниженная активность ГЛК и ЦО, по-видимому, должна сопровождаться уменьшением функциональной деятельности печени самцов СВА, в частности в отношении метаболизма углеводов и жиров. Действительно, печень этих животных часто имеет пастозный вид и содержит необычно большое количество липидов.

Т а б л и ц а 3

Количество белка митохондрий и удельная активность ЦО в печени и гепатомах

Ткань	Белок митохондрий, мг на 1 г сырой массы	ЦО, ΔЕ на 1 мг белка митохондрий за 1 мин	
		Белок митохондрий	Белок гомогената
Гепатома	26±4	0,24	5,0±0,3
Печень опухоленосителя	48±5	0,28	7,3±0,2
Печень самцов СВА (возраст 2 года)	50±5	0,36	6,6±0,3
Печень самцов СВА (возраст 7 мес)	52±5	0,31	10,0±0,3
Печень самцов СЗНА (возраст 7 мес)	65±7	0,33	12,0±0,2

Уменьшение активности ЦО в расчете на белок гомогената печени может происходить за счет снижения количества митохондрий или снижения удельной активности фермента в самих митохондриях, а также за счет обоих процессов одновременно. В табл. 3 приведены данные, проливающие свет на этот вопрос. При сравнении гепатом с печенью нормальных животных и опухоленосителей видно, что в опухолях уменьшаются количество белка митохондрий, а также доля белка митохондрий в общем белке ткани. В то же время наблюдается и некоторое уменьшение удельной активности ЦО в митохондриях, т. е. снижение активности ЦО в ткани гепатомы является в основном следствием убыли количества митохондрий. Снижение количества митохондрий в клетках должно приводить, по-видимому, к ослаблению их многочисленных функций в тканях, включая и биоэнергетические функции, что подробно рассматривалось ранее [6]. При сравнении изучаемых показателей у мышей СВА и СЗНА одного возраста (мес) можно отметить как небольшое уменьшение количества митохондрий, так и снижение удельной активности ЦО в митохондриях мышей СВА. С учетом обоих

этих факторов, мощность митохондриальной системы в расчете на сырую массу ткани в печени мышей низкораковой линии в 1,5 раза выше, чем в печени СВА, что, безусловно, должно сопровождаться снижением функциональной активности печени последних. В частности, это, по-видимому, является одной из основных причин липидной дистрофии гепатом и печени мышей СВА, которая всегда обнаруживается у этих животных. Как видно из табл. 3, в печени животных со спонтанными гепатомами и особенно в самих гепатомах наблюдается уменьшение общего количества белка. Снижение содержания белка и увеличение количества липидов в печени, по-видимому, должно приводить не только к значительным изменениям физико-химических свойств различных мембранных образований гепатоцитов, но

Таблица 4

Активность ГК, ГЛК, ЦО и субклеточное распределение ГК в печени мышей СЗНА с подкожным введением пилюль с о-ААТ

Ткань	Белок митохондрий, мг/г	Белок митохондрий / Белок гомогената	ГК		ГЛК	ЦО
			гомогенат	супернатант		
Печень мышей с ложной операцией (n=7)	72±10	0,33	0,11±0,03	0,11±0,03	0,65±0,05	3,6±0,2
Печень мышей через 1 мес после одного введения о-ААТ (n=9)	26±3	0,21	0,37±0,05	0,40±0,03	0,52±0,07	3,1±0,3
Печень мышей через 4 мес после троекратного введения о-ААТ (n=10)	25±3	0,24	0,28±0,02	0,28±0,02	0,62±0,10	3,7±0,5

Примечание. Активность всех ферментов выражена, как в табл. 2.

и к нарушению их нормального функционирования. В частности, это может быть основной причиной настоящего превращения печени мышей СВА. Представляется также вполне вероятным, что именно увеличение отношения липиды/белок в печени мышей СВА и является основной причиной уменьшения сцепления и ослабления прочности мембран клеток печени у самцов линии СВА, описанных В. И. Левенталем [14]. Этот вопрос, однако, заслуживает дальнейшего изучения и уточнения.

Из приведенных данных следует, что активность ГК, ГЛК, ЦО и количество митохондрий в первичных спонтанных гепатомах изменяются в том же направлении, как и в перевиваемых индуцированных гепатомах мышей СЗНА [6]. Кроме того, в нормальной печени мышей высокоракковой линии СВА по сравнению с печенью мышей низкоракковой линии СЗНА уже в ранние сроки жизни в активности ГЛК, ЦО и количестве митохондрий обнаруживаются изменения в том же направлении, что и в позднее возникающих у этих животных гепатомах. Таким образом, создается впечатление, что уменьшение мощности митохондриальной системы и уменьшение активности функционально связанного с тканью печени фермента — ГЛК — составляют своеобразный предраковый биохимический фон для последующего развития у этих животных гепатом. Чтобы проверить это предположение, были проведены специальные исследования на мышях линии СЗНА, которым под кожу спины 1 раз в месяц вводили пилюли с гепатоканцерогеном — о-ААТ. Этот способ введения имеет ряд преимуществ. Канцероген всасы-

вается медленно, и печень подвергается его непрерывному воздействию. Вследствие этого наблюдаются минимальное повреждение и стимуляция различных эндокринных систем организма. В пользу этого свидетельствует по крайней мере то обстоятельство, что печень животных макроскопически выглядит нормальной и в ней не обнаруживаются те сильные морфологические изменения, которые столь характерны для воздействия многих гепатоканцерогенов [15].

Результаты опытов приведены в табл. 4. Видно, что уже через месяц после однократного введения о-ААТ в печени в 4 раза увеличивается активность ГК и в 2,8 раза уменьшается количество белка митохондрий, причем доля митохондриального белка от белка гомогената снижается на 40%. Одновременно уменьшается на 40% и общее количество белка в расчете на сырую массу ткани. Активность ЦО в расчете на сырую массу ткани печени уменьшается в 2 раза. Активность ГЛК в печени подопытных мышей остается без изменений. После трехкратного введения о-ААТ активность ГК несколько уменьшается, хотя и остается почти в 3 раза выше, чем в печени контрольных животных, а количество белка митохондрий и гомогената остается таким же низким, как и после однократного введения. Таким образом, однократное введение печеночного канцерогена о-ААТ приводит к изменениям активности ГК и количества митохондрий, которые характерны и для ткани спонтанных гепатом. Кроме того, общее количество белка гомогената и митохондрий, а также мощность митохондриальной системы изменяются под действием о-ААТ в ту же сторону, что и в печени мышей высокоракковой линии СВА.

Совокупность приведенных данных, по-видимому, позволяет сделать вывод о том, что ослабление функциональной активности печени мышей СВА, выражающееся в снижении активности ГЛК и уменьшении мощности митохондриальной системы, вероятнее всего, представляет собой коканцерогенный фон, способствующий, а возможно, и приводящий в последующем к малигнизации гепатоцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Моррис Г. П. — В кн.: Успехи в изучении рака. М., 1970, т. 9, с. 365.
2. Гельштейн В. И. — Цитология, 1971, № 1, с. 3.
3. Гобеев В. Н., Давыдова С. Я., Хрипач Л. В. и др. — Докл. АН СССР, 1976, т. 226, с. 1210.
4. Sydow G. — Acta biol. med. germ., 1967, Bd 18, Kl. — с. 750.
5. Гобеев В. Н., Березов Т. Т. — Докл. АН СССР, 1976, т. 227, с. 750.
6. Гобеев В. Н. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 2150.
7. Cooperstein S. J., Lazagov A. — J. biol. Chem., 1951, v. 189, p. 665.
8. Eaton G. M., Brewster G. J., Tashian R. E. — Nature, 1966, v. 212, p. 944.
9. Goa J. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1953, v. 5, p. 218.
10. Anderson J. W., Herman F. H., Tugel J. B. et al. — Am. J. clin. Nutr., 1971, v. 24, p. 642.
11. Sydow G. — Hoppe-Seyler's, Z. physiol. Chem., 1969, Bd 350, S. 263.
12. Гобеев В. Н., Хрипач Л. В. — Вopr. мед. химии, 1976, т. 22, с. 798.
13. Logg, Cristofalo V. J., Morris H. P. et al. — Cancer Res., 1968, v. 28, p. 1.
14. Левенталь В. И. Влияние физико-химических факторов и биологически активных веществ на механические свойства контактов и поверхности клеток печени. Автореф. дис. канд. М., 1976.
15. Быкорез А. И., Пинчук В. Г. Экспериментальные опухоли печени. Киев, 1976.

Поступила 1/VIII 1977 г.

#### SOME BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF LIVER TISSUE FROM MICE OF STRAINS WITH HIGH AND LOW CARCINOMATOSIS AND OF PRIMARY SPONTANEOUS HEPATOMAS

V. N. Gobeev, L. V. Khripach, T. T. Beresov

Chair of Biochemistry, P. Lumumba University, Moscow

Sex differences in development of spontaneous liver tumors were studied in mice of CBA strain. Content of mitochondrial proteins, activities of cytochrome oxidase, glucokinase, hexokinase as well as subcellular distribution of hexokinase were also studied in primary hepatomas and in normal liver tissue of the mice of CBA and C3HA strains. Liver tumors occurred in males of CBA strain 7-fold more frequently than in females. Activities of hexokinase,

glucokinase, cytochrome oxidase and content of mitochondrial proteins were distinctly altered both in primary spontaneous hepatomas and in transplantable strains. But, contrary to the transplantable tumors, in spontaneous hepatomas hexokinase, associated with mitochondria, was not found. Decrease in activities of glucokinase and cytochrome oxidase was observed at the early stages of development of CBA strain in males as compared with females of CBA and males of C3H/4 strains, i. e. distinct decrease in several functional patterns of liver tissue was observed. Subcutaneous administration of orthoamine azobenzene into mice of the C3H/4 strain caused alteration in activity of these enzymes from liver tissue, which was typical for hepatomas, already at the early steps of development.

УДК 616.13-004.6-092:612.017.1

А. Н. Климов, А. Д. Денисенко, Ю. Н. Зубицкий, Е. А. Герцикова

### ОБНАРУЖЕНИЕ АУТОИММУННОГО КОМПЛЕКСА ЛИПОПРОТЕИД—АНТИТЕЛО В ПЛАЗМЕ КРОВИ И СТЕНКЕ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

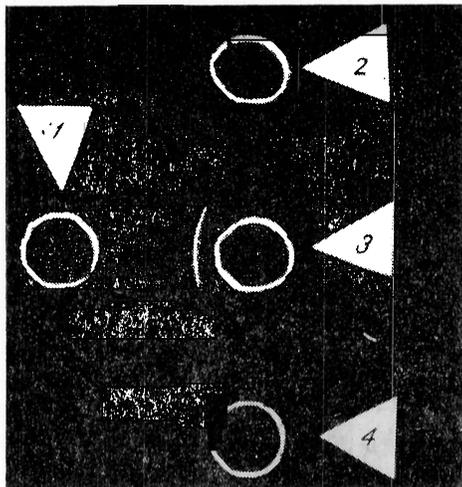
*В тканевой жидкости пораженной атеросклерозом аорты и плазме крови человека обнаружен иммунный комплекс липопротеид — антитело. Антигенным компонентом иммунного комплекса в большинстве случаев является липопротеид очень низкой плотности. После диссоциации комплекса в кислой среде выделял иммуноглобулин G, идентифицированный методом двойной иммунодиффузии в агаре, который обладал способностью реагировать в реакции связывания комплемента как с аутологичными, так и, в некоторых случаях, с гетерологичными липопротеидами.*

В последние годы внимание исследователей привлекают иммунологические механизмы развития атеросклероза. В ряде работ были получены данные, предполагающие наличие в крови человека антител (АТ) к антигенам сосудистой стенки [1, 2]. После того как у лиц с миеломной болезнью и гиперхолестеринемией в крови были обнаружены иммунные комплексы липопротеид (ЛП) — АТ, было выдвинуто предположение, что гиперлипидемия в ряде случаев объясняется образованием упомянутого выше комплекса [3]. Позднее эта точка зрения распространилась и на атеросклероз, в патогенезе которого некоторые авторы стали допускать участие иммунологических факторов [4, 5]. На основании экспериментальных исследований, выполненных на кроликах, была сформулирована аутоиммунная теория патогенеза атеросклероза, согласно которой при гиперхолестеринемии в плазме крови животных появляются измененные ЛП, на которые вырабатываются специфические АТ и в конечном счете образуются растворимые аутоиммунные комплексы ЛП—АТ. Последние при фиксации в сосудистой стенке вызывают ее повреждение и индуцируют и (или) утяжеляют развитие атеросклероза [4, 5]. Это предположение подтверждается данными о том, что у кроликов при алиментарной гиперхолестеринемии в крови увеличивается содержание у-глобулинов [6]. В нашем институте было показано с помощью реакции Бойдена наличие в крови свободных АТ к ЛП уже через 1—4 нед и иммунных комплексов ЛП—АТ в более поздние сроки кормления кроликов холестерином [4]. Присутствие подобных комплексов в крови или стенке аорты людей без явной патологии иммунной системы не показано. Поэтому в настоящей работе впервые предпринята попытка выделить аутоиммунный комплекс ЛП—АТ из плазмы крови и стенки аорты человека.

#### Методика

Для выделения иммунных комплексов использовали плазму крови, полученную от практически здоровых мужчин в возрасте 45—55 лет после 14-часового голодания. Кроме того, исследовали аорты и образцы крови, взятые при вскрытии лиц, погибших от различных причин. Из стенки аорты получали тканевую жидкость, как описано ранее [7]. Из сыворотки крови и тканевой жидкости стенки аорты выделяли ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) с помощью ультрацентрифугирования при плотности среды 1,006 г/мл [8]. Для обнаружения комплекса ЛП—АТ использовали как ЛПОНП (верхняя фракция после ультрацентрифугирования), так и суммарную фракцию ЛП

низкой плотности (ЛПНП) и ЛП высокой плотности (ЛПВП) (нижняя фракция после ультрацентрифугирования). С этой целью выделенные ЛП растворяли в буфере Михаэлиса рН 2,5 (конечный объем 10 мл) и добавляли 5 г сухого  $BaSO_4$ , на котором сорбировались ЛП [9]. Пробы оставляли на 10 мин при комнатной температуре, после чего производили центрифугирование при 3000 об/мин в течение 10 мин. Если использовали ЛПОНП, то супернатант нейтрализовали до рН 7,4 с помощью 0,1 н.



Идентификация АТ, выделенного из иммунного комплекса ЛП—АТ тканевой жидкости аорты человека с помощью двойной иммунодиффузии в агаре со специфическими антисыворотками против человеческих иммуноглобулинов.

1 — антисыворотка против человеческого иммуноглобулина G; 2 — антисыворотка против человеческого иммуноглобулина A; 3 — АТ, выделенное из иммунного комплекса ЛП — АТ; 4 — антисыворотка против человеческого иммуноглобулина M.

лемента (РСК) [10]. РСК проводили следующим образом: к 1 мл раствора АТ добавляли 1 мл раствора антигена (ЛП, сорбированные на  $BaSO_4$ , или раствор ЛП) и 1 мл раствора стандартного комплемента морской свинки в рабочем разведении 1 : 3. Концентрация белка, определяемого по Лоури [11], в растворе АТ колебалась от 10 до 300 мкг/мл. Контролем служили пробы, в которые вместо раствора выделенных АТ добавляли 1 мл буфера или раствор стандартного иммуноглобулина G, а также пробы, в которые вместо раствора антигена добавляли суспензию  $BaSO_4$  в буфере или раствор альбумина. Пробы перемешивали и инкубировали 18 ч при 4°C. Содержание комплемента в пробах с разведением 1 : 2—1 : 64 определяли по лизису бараньих эритроцитов гемолитической сывороткой.

Реакцию двойной иммунодиффузии в агаре производили по методу Оухтерлонни [12]. Содержание холестерина и триглицеридов в плазме крови определяли с помощью автоанализатора АА-2 фирмы «Technicon».

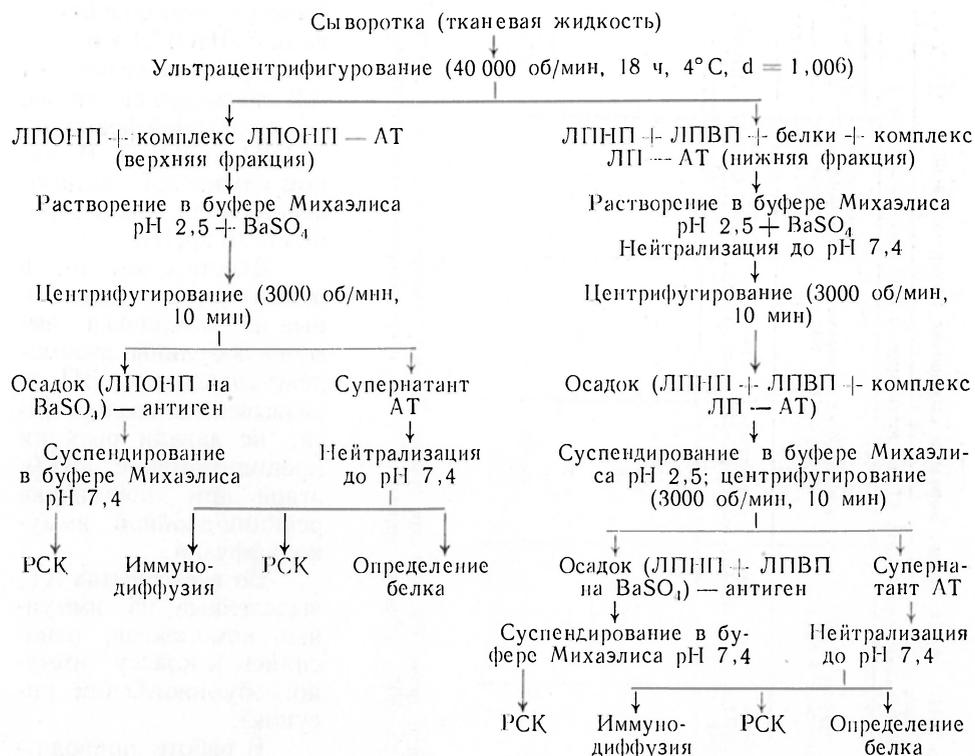
## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты поисков иммунного комплекса ЛП—АТ в крови практически здоровых мужчин. Как видно из табл. 1, у 12 из 15 обследованных мужчин был обнаружен в крови иммунный комплекс ЛП—АТ, причем у 11 из них этот комплекс флотировал при ультрацентрифугировании в плотности 1,006 г/мл, т. е. в комплекс входили ЛПНОН, а у 1 пациента комплекс находился во фракции с  $d > 1,006$ . АТ, выделенные из комплекса ЛПОНП—АТ, в 3 случаях из 6 взаимодействовали с изоэлогичными ЛПОНП с фиксацией комплемента. В 1 случае эти АТ также специфически взаимодействовали с суммарной фракцией ЛПНП и ЛПВП.

NaOH и использовали его как раствор АТ. Осадок, содержащий сорбированные на  $BaSO_4$  ЛП, суспендировали в 10 мл буфера Михаэлиса рН 7,4 и использовали как антиген. Если для обнаружения иммунного комплекса использовали нижнюю фракцию после ультрацентрифугирования, то после сорбции ЛП на  $BaSO_4$  в кислом буфере рН раствора доводили до 7,4 для рекомбинации комплекса и фиксации его на  $BaSO_4$ , центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин и супернатант отбрасывали, а с сорбированного на осадке  $BaSO_4$  иммунного комплекса ЛП—АТ кислым буфером рН 2,5 элюировали АТ. Представлена схема выделения АТ из иммунного комплекса ЛП—АТ.

Кроме того, для выделения АТ к ЛП из фиксированных в стенке аорты нерастворимых аутоиммунных комплексов пользовались следующим приемом. После измельчения ножницами ткань аорты (интима и медиа) вымачивали в 60 мл нейтрального буфера Михаэлиса 3—4 раза по 30 мин, что позволяло практически полностью элюировать из аорты растворимые ЛП и иммуноглобулины (по данным двойной иммунодиффузии в агаре со специфическими антисыворотками и электрофореза в полиакриламидном геле), а затем кислым буфером Михаэлиса элюировали АТ. Полученный элюат нейтрализовали до рН 7,4 и использовали в качестве АТ для постановки реакции связывания комп-

При одновременном исследовании сыворотки крови и стенки аорты комплекс ЛП—АТ был обнаружен в стенке аорты в 7 из 8 случаев (табл. 2). В 2 случаях этот комплекс имел плотность меньше 1,006 г/мл, в 3 — больше 1,006 г/мл и в 2 случаях комплекс обнаружен в обеих фракциях тканевой жидкости стенки аорты. У 3 из этих лиц обнаружен иммунный комплекс,



Т а б л и ц а 1

Обнаружение аутоиммунного комплекса ЛП — АТ в крови мужчин 45—55 лет

Метаболиты в плазме		Реакция связывания комплемента			
холестерин, мг%	триглицериды, мг%	АТ, выделенное из комплекса с d < 1,006		АТ, выделенное из комплекса с d > 1,006	
		с аутологичными ЛПОНП	с аутологичными ЛПНП + ЛПВП	с изологичными ЛПОНП	с аутологичными ЛПНП + ЛПВП
183	43	+	—	—	—
197	55	+	—	—	—
208	253	+	—	—	—
213	128	+	—	—	—
231	94	+	—	—	—
257	67	—	—	—	+
273	227	—	—	—	—
283	183	+	—	—	—
284	289	+	—	+	—
285	265	—	—	—	—
289	200	+	+	+	—
293	107	—	—	—	—
297	115	+	—	+	—
343	216	+	—	—	—

П р и м е ч а н и е. Знак + означает, что атеросклеротические поражения занимают менее 5% площади аорты.



сти среды 1,006 г/мл. Косвенным доказательством этого является тот факт, что АТ, элюированные из фиксированных в стенке аорты нерастворимых аутоиммунных комплексов, во всех случаях специфически связывались с ЛПОИП и лишь в 2 случаях — с ЛП более высокой плотности. Кроме того, у пациента 67 лет (см. табл. 2) иммунный комплекс, выделенный из стенки аорты, не флотировал при плотности среды 1,006 г/мл, тогда как в сыворотке крови он обнаруживался во фракции с  $d < 1,006$ .

На основании имеющихся данных трудно предположить, какой компонент липопротеидной частицы является антигенной детерминантой. Следует лишь отметить, что в тех случаях, когда антигенной детерминантой являются липиды, АТ связываются как с изо-, так и с гетерологичными ЛП [13], тогда как в наших опытах реакция АТ с изоэлогичными ЛП обнаружена лишь в 4 из 8 случаев. Кроме того, в нашем исследовании антигенным компонентом иммунного комплекса в большинстве случаев является ЛПОИП, который, как известно, содержит множественный и меняющийся набор аполипопротеидов. Не исключено, что изменение состава последних и придает ЛПОИП антигенные свойства.

Полученные данные позволяют предполагать, что аутоиммунные механизмы развития атеросклеротических поражений могут проявляться у человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шварц Л. С., Есафьева Т. В. — «Клин. мед.», 1968, № 8, с. 110. —
2. Шварц Л. С., Архангельский А. В. — «Врач. дело», 1970, № 8, с. 53. —
3. Beaumont J.-L. — In.: Atherosclerosis: Proceedings of the 2d International Symposium. New York, 1970, p. 166. —
4. Иоффе В. И., Зубжидский Ю. Н., Нагорнев В. А. и др. — «Бюлл. exper. биол.», 1973, № 6, с. 72. —
5. Климов А. Н. — «Вестн. АМН СССР», 1974, № 2, с. 29. —
6. Ловягина Т. Н. — «Вопр. мед. химии», 1960, № 4, с. 358. —
7. Климов А. Н., Денисенко А. Д., Маграчева Е. Я. (Климов А. Н., Денисенко А. Д., Маграчева Е. Я.) — «Atherosclerosis», 1974, v. 19, p. 243. —
8. Havel R. J., Eder H. A., Bregdon J. H. — «J. clin. Invest.», 1955, v. 34, p. 1345. —
9. Birstein M., Scholnick H. R. — «Nouv. Rev. franç. Hemat.», 1970, v. 10, p. 181. —
10. Chudomel V., Jezkova A. — «Lancet», 1961, v. 1, p. 965. —
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. —
12. Ouchterlony O. — «Acta path. scand.», 1953, v. 13, p. 231. —
13. Beaumont J.-L., Beaumont V., Antonucci M. et al. — Ann. Biol. Clin., 1970, v. 28, p. 387.

Поступила 8/VI 1977 г.

#### DETECTION OF AUTOIMMUNE COMPLEX LIPOPROTEIN-ANTIBODY IN HUMAN BLOOD PLASMA AND AORTA WALL

A. N. Klimov, A. D. Denisenko, Yu. N. Zubzhitsky, E. A. Gerchikova

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

An immune complex of lipoprotein-antibody was found in human blood plasma and in tissue liquid of aorta, impaired by atherosclerosis. In the majority of cases the antigen component of the immune complex was lipoprotein of very low density. After dissociation of the complex at acid pH, immunoglobulin G was isolated, which was identified by double immunodiffusion in agar gel; the immunoglobulin reacted in RBS both with autological and, in some cases, with isologous lipoproteins.

Д. Б. Цукерман, И. В. Вережкина, В. З. Горкин

## ОКИСЛЕНИЕ МОНОАМИНОВ В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПОЧЕК БЫКА, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ МОНОАМИНОКСИДАЗОЙ ТИПА Б

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

*Окислительное дезаминирование тирамина, серотонина и бензиламина при их инкубации с митохондриальной фракцией почек быка блокируют низкие концентрации депренила, но не хлоргелина. Этот факт, а также характер кривых зависимости величин остаточной моноаминоксидазной активности от концентрации ингибитора и результаты опытов, проведенных методом «смешанных субстратов», свидетельствуют о наличии в митохондриальной фракции почек быка только моноаминоксидазы типа Б, что необходимо учитывать при исследованиях природы моноаминоксидаз с использованием ферментных препаратов из митохондрий почек быка как богатого источника моноаминоксидазной активности.*

В исследованиях природы моноаминоксидазы [амин: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (флавинодержащая), КФ 1.4.3.4] после обнаружения свойства многих химических соединений избирательно блокировать окислительное дезаминирование различных биогенных моноаминов [1—3] важное значение приобрел ингибиторный анализ, на основании результатов которого выдвинуты современные представления о существовании в организме по крайней мере двух типов моноаминоксидаз — А и Б [4]. Моноаминоксидазами типа А называют аминоксидазы, активность которых тормозят низкие (микромольные) концентрации хлоргелина (N-[2,4-дихлорфенокси]пропил-N-метил-2-пропаниламин гидрохлорид [5, 6]; активность моноаминоксидаз типа Б тормозят низкие концентрации депренила (N-1-фенилизопропил-N-метил-2-пропаниламин гидрохлорид) [7], но не хлоргелина. При патологических состояниях (например, при шизофрении, маниакально-депрессивных психозах) активность моноаминоксидаз типов А и Б, которые различаются между собой по субстратной специфичности и, вероятно, по многим физико-химическим свойствам, изменяется по-разному. Поэтому в исследованиях природы моноаминоксидаз важное значение имеют результаты ингибиторного анализа, позволяющие отнести моноаминоксидазы исследуемых объектов к одному из основных типов моноаминоксидаз и (или) охарактеризовать их количественные соотношения.

Наиболее богатым источником моноаминоксидазной активности в организме млекопитающих считают митохондрии почек быка [8], которые были использованы для получения высокоочищенных препаратов моноаминоксидазы [9] и для проведения целого ряда энзимологических исследований [10].

В настоящей работе мы поставили перед собой задачу исследовать торможение моноаминоксидазной активности митохондрий почек быка современными мощными ацетиленовыми ингибиторами моноаминоксидаз [11], с тем чтобы охарактеризовать моноаминоксидазу данного биологического объекта в терминах принятой в настоящее время классификации моноаминоксидаз [4, 6].

### М е т о д и к а

Митохондриальную фракцию выделяли путем дифференциального центрифугирования 10% гомогената коркового слоя почек быка в 0,25 М растворе сахарозы с последующим промыванием гипотоническим фосфатным буферным раствором [12]. Полученный осадок сохраняли при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для солиubilизации митохондриальных мембран суспензию фрагментов митохондриальных мембран [13], содержащую 10 мг белка в 1 мл 0,01 М фосфатного буфера рН 7,4, подвергали замораживанию — оттаиванию, а затем воздействию ультразвуковых волн (генератор УЗДН-1; 35 кГц) при  $0^{\circ}\text{C}$  общей длительностью 30 мин. После этого в суспензию добавляли неионный детергент тритон X-100 (фирма «Ромм и Хаас», США) до конечной концентрации 1,5% и подвергали ультразвуковому воздействию еще 15 мин. Затем суспензию центрифугировали (105 000 g, 120 мин, препаративная ультрацентрифуга MSE, Англия); осадок отбрасывали, а надосадочную

жидкость, содержащую обычно 55—65% моноаминоксидазной активности (субстраты тирамин, серотонин, бензиламин, фенилэтиламин, 4-нитрофенилэтиламин) исходной суспензии митохондриальной фракции почек быка, использовали в опытах в качестве солиобилизованных митохондриальных мембран.

В качестве субстратов применяли без дополнительной очистки тирамин хлоргидрат (Мерк, ФРГ), серотонин креатининсульфат («Реанал», Венгрия), дофамин хлоргидрат («Ферак», ФРГ),  $\beta$ -фенилэтиламин хлоргидрат (любезно предоставлен доктором М. Сэндлером, Англия). Бензиламин хлоргидрат производства Харьковского завода химреактивов использовали в качестве субстрата после двукратной перекристаллизации из смеси ацетон — вода (10 : 1).

Ингибиторы моноаминоксидаз хлоргидрин и депренил любезно предоставили нам доктор Барбер (фирма «Мэй и Бэйкер», Англия) и доктор Мадьяр (Институт фармакологии Медицинского университета, Венгрия) соответственно.

О скорости окислительного дезаминирования судили по количеству аммиака, освобождаемого в ходе инкубации при оптимальных для каждого исследуемого амина условиях [14] в присутствии митохондрий почек быка (по 2 мг белка на пробу объемом 1,8 мл). Инкубацию во всех случаях проводили в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4. Найденные в специальных предварительных опытах оптимальные конечные концентрации субстратов были (в мМ): тирамин — 3,6; серотонин — 6,9; фенилэтиламин — 1,4; дофамин — 3; бензиламин — 2,8. Длительность инкубации при 37°C в атмосфере кислорода составляла 50 мин, в течение которых, как было установлено предварительными опытами, реакции дезаминирования исследованных биогенных моноаминов следовали уравнению нулевого порядка. В опытах с бензиламином в качестве субстрата моноаминоксидазную активность определяли также спектрофотометрическим методом, основанным на измерении начальной скорости образования бензальдегида в течение 5 мин после начала реакции [14]. Содержание белка определяли колориметрически по Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

## Результаты и обсуждение

Как следует из данных, представленных в табл. 1, при инкубировании в атмосфере кислорода с митохондриальными фракциями почек быка было обнаружено дезаминирование всех исследованных моноаминов. Среди избранных для этого исследования моноаминов были субстрат моноаминоксидаз типа А — серотонин, субстраты моноаминоксидаз типа Б —  $\beta$ -фенилэтиламин и бензиламин, а также биогенные моноамины тирамин и дофамин, которые служат субстратами для моноаминоксидаз обоих основных типов [4, 6].

Было установлено также (см. табл. 1), что солиобилизованные митохондриальные мембраны почек быка не отличались от исходной митохондриальной фракции по соотношению скоростей дезаминирования инкубируемых с ними моноаминов. Таким образом, проницаемость биомембран для моноаминов в данном случае не имела существенного значения как фактор, возможно, влияющий на соотношение скоростей дезаминирования аминов митохондриальной фракции.

Зависимость скорости реакции окислительного дезаминирования от концентрации аминов исследовали в специально избранных диапазонах кон-

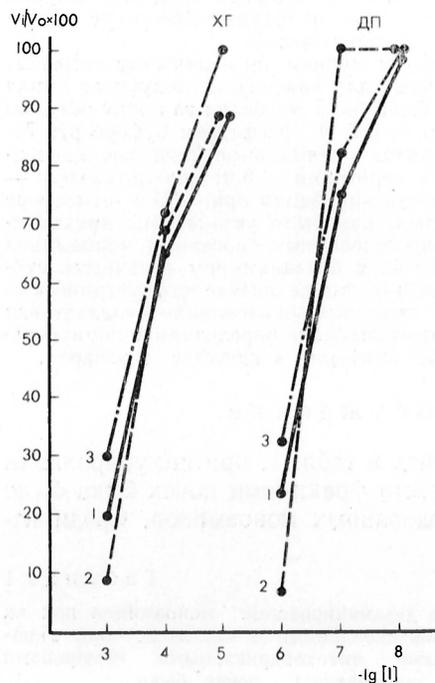
Таблица 1

Окислительное дезаминирование моноаминов при их инкубации с митохондриями (в числителе) или солиобилизованными митохондриальными мембранами (в знаменателе) почек быка

Моноамины	Освобожденные аммиака, мкмоль на 1 кг белка за 50 мин	Относительная скорость дезаминирования, %
Тирамин	4,13	100
	23,2	100
Серотонин	1,23	30
	7,3	31
Дофамин	1,73	42
	8,32	36
Бензиламин	2,47	60
	0,53	13
Фенилэтиламин	3,7	16

Примечание. В пробы вносили по 2 мг белка митохондрий или по 0,2—0,4 мг белка солиобилизованных митохондриальных мембран почек быка. Оптимальные концентрации субстратов см. в разделе «Методика». Представлены средние величины по данным двух параллельных определений.

центраций, в пределах которых явление субстратного торможения не было выражено. Эти диапазоны концентраций (в мМ) составляли для тирамина от 0,071 до 3,6, для серотонина — от 0,56 до 5,6, для бензиламина и фенилэтиламина — от 0,28 до 2,8. В пределах каждого диапазона были определены величины скорости дезаминирования при 6 различных концентрациях моноаминов. Графики зависимости величин, обратных скорости дезаминирования, от величин, обратных конечным концентрациям моноаминов в пробах, были линейны в пределах указанных диапазонов. Вычисленные по этим графикам



кажущиеся величины констант Михаэлиса ( $K_m$ ) реакций окислительного дезаминирования ряда моноаминов моноаминоксидазами солюбилизованных митохондриальных мембран почек быка (состав проб и условия опытов см. в тексте и в подписи к табл. 1) были следующими (в мМ): для тирами-

Торможение хлоргилином (ХГ) или депренилом (ДП) окислительного дезаминирования тирамина (1), серотонина (2) или бензиламина (3) при их инкубации с митохондриальной фракцией почек быка.

Состав проб и условия опытов: в пробы (конечный объем 1,8 мл), содержавшие 0,1 М фосфатный буфер рН 7,4, вносили по 2 мг белка митохондрий и один из ингибиторов (отрицательные логарифмы конечных концентраций ингибиторов указаны на оси абсцисс), после чего пробы преинкубировали 20 мин при комнатной температуре. Контрольные пробы, в которые ингибиторы не добавляли, преинкубировали при тех же условиях. Для измерения скорости дезаминирования в контрольных ( $V_0$ ) и в преинкубированных с ингибиторами ( $V_i$ ) пробах в них вносили затем соответствующие субстраты в оптимальных концентрациях (см. в разделе «Методика»). Скорость дезаминирования бензиламина измеряли спектрофотометрически, тирамина и серотонина — по освобождению аммиака. По оси ординат отложены найденные соотношения  $(V_i/V_0) \times 100$ . Представлены средние величины по данным 4 параллельных определений.

на — 1,1; для серотонина — 3,8; для бензиламина — 0,2; для фенилэтиламина — 0,24. Таким образом, для бензиламина и фенилэтиламина эти величины были примерно в 20 раз меньше соответствующей величины для серотонина и примерно в 5 раз меньше кажущейся  $K_m$  для тирамина. Полученные результаты наводили на мысль о наличии в митохондриальной фракции почек быка в качестве преобладающего (или единственного) типа моноаминоксидазы именно моноаминоксидазы типа Б, для которой бензиламин и  $\beta$ -фенилэтиламин являются специфическими субстратами, тогда как серотонин, тирамин или другие моноамины окисляются лишь при добавлении их в пробы в высоких концентрациях [14].

Эта гипотеза получила полное подтверждение при ингибиторном анализе. Как следует из рисунка, именно депренил, специфический ингибитор моноаминоксидаз типа Б, тормозил в низких (в микромолях) концентрациях дезаминирование не только бензиламина, но и тирамина и серотонина. Специфический ингибитор моноаминоксидаз типа А хлоргилин тормозил эти реакции лишь при внесении его в пробы в 1000 раз более высоких (в миллимолях) концентрациях. На кривых зависимости величин остаточной ферментативной активности ( $V_i/V_0$ ) от конечных концентраций ингибиторов в пробах не было отмечено «плато», характерных для двухфазных систем, содержащих моноаминоксидазы типов А и Б, как это имеет место, например, в митохондриальных фракциях мозга или печени [5, 6]. Эти данные свидетельствуют о наличии в митохондриальной фракции почек быка лишь одного типа моноаминоксидазы, а именно моноаминоксидазы типа Б.

Для исключения возможного (хотя и маловероятного [15]) искажения действия ингибиторов моноаминоксидаз благодаря наличию фрагментов биомембран изложенные выше опыты были повторены с использованием

Т а б л и ц а 2

Торможение ингибиторами моноаминоксидаз дезаминирования моноаминов при их инкубации с митохондриями (в числителе) или солюбилизованными митохондриальными мембранами: (в знаменателе) почек быка

Ингибиторы моноаминоксидаз	Концентрация, мкМ	Торможение дезаминирования, %		
		тирамина	серотонина	бензиламина
Хлоргилин	1000	79	91	69
		79	75	67
	100	35	31	28
		32	29	37
	10	11	11	0
0		0	15	
1	76	94	66	
	100	80	88	
Депренил	0,1	25	0	17
		20	20	0
	0,01	0	0	0
		10	5	0

Примечание. Пробы содержали по 2 мг белка митохондриальных фракций или по 0,2—0,4 мг белка солюбилизованных митохондриальных мембран почек быка. Условия преинкубации с ингибиторами моноаминоксидаз см. в подписи к рисунку. Контрольные пробы преинкубировали без добавления ингибиторов. Представлены средние величины по данным 4 определений.

вместо суспензий митохондриальной фракции почек быка солюбилизованных митохондриальных мембран почек быка.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, солюбилизованные митохондриальные мембраны почек быка практически не отличались от исходных митохондриальных фракций по чувствительности реакций дезаминирования тирамина, серотонина и фенилэтиламина к тормозящему действию хлоргилина и депренила.

Дополнительное подтверждение вывода о наличии в митохондриальной фракции почек быка только моноаминоксидаз типа Б было получено в опытах, проведенных методом «смешанных субстратов» с учетом теоретической разработки и способов расчета, опубликованных за последние годы [17]. Как видно из результатов опыта, представленных в табл. 3, при любых попарных сочетаниях моноаминов в пробах с митохондриальными фракциями почек быка величины, выражающие отношение скорости окисления смеси субстратов в пробе к арифметической сумме ско-

Т а б л и ц а 3

Дезаминирование одновременно внесенных в пробы моноаминов («смешанных субстратов») митохондриальной моноаминоксидазой почек быка

Сочетания моноаминов	Отношение скорости дезаминирования «смешанных субстратов» к арифметической сумме скоростей дезаминирования соответствующих субстратов, инкубируемых порознь, %
Тирамин + серотонин	64
» + бензиламин	68
» + фенилэтиламин	72
Серотонин + бензиламин	30
» + фенилэтиламин	40
Бензиламин + фенилэтиламин	22

ростей окисления субстратов, инкубированных с митохондриями порознь, либо близки к величине 66,7%, либо ниже этой величины [17]. Этот результат свидетельствует о взаимной конкуренции субстратов за один активный центр (один фермент).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Веревкина И. В., Горкин В. З., Гриднева Л. И. и др. — «Докл. АН СССР», 1964, т. 157, № 1, с. 191. — 2. Gorkin V. Z., Komisargova N. V., Legman M. I. et al. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1964, v. 15, p. 383. — 3. Gorkin V. Z. — «Pharmacol. Rev.», 1966, v. 18, p. 115. — 4. Горкин В. З. — «Ж. Всесоюз. хим. о-ва», 1976, т. 21, № 2, с. 181. — 5. Johnston J. P. — «Biochem. Pharmacol.», 1968, v. 17, p. 1285. — 6. Neff N. H., Yang H.-Y. — «Life Sci.», 1974, v. 14, p. 2061. — 7. Knoll J., Magyar K. — «Advanc. Biochem. Psychopharmacol.», 1972, v. 5, p. 393. — 8. Erwin V. G., Hellerman L. — «J. biol. Chem.», 1967, v. 242, p. 4230. — 9. Dugal B. S. — «Biochim. biophys. Acta», 1976, v. 480, p. 56. — 10. Patek D. R., Hellerman L. — «J. biol. Chem.», 1974, v. 249, p. 2373. — 11. Горкин В. З. — «Хим.-фарм. ж.», 1977, № 1, с. 6. — 12. Горкин В. З., Веревкина И. В. — «Вопр. мед. химии», 1963, № 3, с. 315. — 13. Акоруян З. И., Веруовкина И. В. et al. — «Int. J. Protein Res.», 1971, v. 3, p. 121. — 14. Горкин В. З. и др. — В кн.: Современные методы в биохимии. Т. 2. М., 1968, с. 155. — 15. Ekstedt B., Orcland L. — «Arch. int. Pharmacodyn.», 1976, v. 222, p. 157. — 16. Singer S. J. — «Ann. Rev. Biochem.», 1974, v. 43, p. 805. — 17. Houslay M. D., Tipton K. F. — «Biochem. Pharmacol.», 1975, v. 24, p. 627.

Поступила 8/VIII 1977 г.

#### OXIDATION OF MONOAMINES IN BOVINE KIDNEY MITOCHONDRIAL FRACTION IS CATALYSED BY TYPE B MONOAMINE OXIDASE

*D. B. Zuckerman, I. V. Veryovkina, V. Z. Gorkin*

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Oxidative deamination of tyramine, serotonin and benzyl amine in bovine kidney mitochondria was inhibited by low concentrations of deprenil (but not clorgylline). These data and the patterns of the plots of residual enzymatic activity against concentration of the inhibitors as well as the «mixed substrates» experiments suggest occurrence in bovine kidney mitochondria of monoamine oxidase of the B type only, which has to be considered in studies on the nature of monoamine oxidases using bovine kidney mitochondria as a rich source of monoamine oxidase activity.

УДК 612.744.2.015.11:577.152.143

*Л. В. Татьянаенко, Л. М. Райхман, И. В. Веревкина, Н. В. Васюкова*

#### УЧАСТИЕ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ТИПА Б В РЕГУЛЯЦИИ $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ -ЗАВИСИМОЙ АТФ-АЗЫ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям химических соединений, Купавна Московской области, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

*Альдегиды, образующиеся при окислительном дезаминировании субстратов моноаминоксидазы типа Б, ингибируют  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимую АТФ-азу саркоплазматического ретикулума.*

Ранее нами было обнаружено, что в мембранных препаратах саркоплазматического ретикулума присутствует моноаминоксидазная активность [1], особенности субстратной и ингибиторной специфичности которой указывают на ее принадлежность к моноаминоксидазе (МАО) типа Б, которая специфически окисляет  $\beta$ -фенилэтиламин или бензиламин и блокируется низкими концентрациями депренила. Для того чтобы выяснить, какую функцию выполняет МАО в саркоплазматическом ретикулуме, мы исследовали влияние

гомогенного препарата МАО и субстратов этого фермента на активность очищенной  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы ( $\text{Ca}$ -АТФ-азы), выделенной из саркоплазматического ретикулула.

### Методика

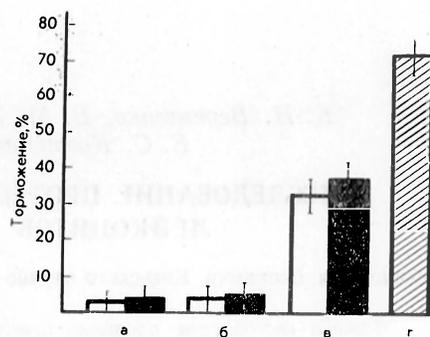
Саркоплазматический ретикулум получали из гомогенатов белых мышц задних конечностей кролика путем дифференциального центрифугирования (собирали фракции, осаждающиеся при 40 000 g за 90 мин и при 100 000 g за 30 мин). Для выделения солюбилизированного препарата  $\text{Ca}$ -АТФ-азы осадок мембран саркоплазматического ретикулула обрабатывали в течение 60 мин раствором холата натрия (0,5 мг холата на 1 мг белка), как указано в работе [2], и затем центрифугировали 60 мин при 140 000 g. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок отмывали от холата раствором, содержащим 0,3 M сахарозы, 10 mM имидазола, 100 mM NaCl, pH 7,0, и собирали центрифугированием (60 мин при 140 000 g).

АТФ-азную активность измеряли рН-метрическим методом [3]. Содержание белка в пробах определяли колориметрическим методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта [4]. Источники получения и характеристики использованных в работе аминов и ингибиторов МАО были указаны ранее [5]. Гомогенный препарат МАО получали из митохондрий печени крысы [6].

### Результаты и обсуждение

Результаты проведенных опытов представлены на рисунке. Как видно из данных,  $\beta$ -фенилэтиламин и бензиламин — аминопроизводные ароматических углеводов, являющиеся субстратами для МАО типа Б, сами по себе в отсутствие МАО не влияют на активность  $\text{Ca}$ -АТФ-азы. Однако, если наряду с этими субстратами в среде присутствует МАО, АТФ-азная активность тормозится на 30—35%. При блокировании МАО специфическим ингибитором депренилом этого торможения не наблюдается. Отсюда можно предположить, что образующиеся под действием МАО продукты окислительного дезаминирования  $\beta$ -фенилэтиламина и бензиламина (соответствующие альдегиды) являются ингибиторами  $\text{Ca}$ -АТФ-азы, что подтверждается прямыми опытами по действию бензальдегида на этот фермент. В концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  M бензальдегид тормозит  $\text{Ca}$ -АТФ-азу более чем на 70% (см. рисунок, г). Ингибирующее действие бензальдегида не зависит от присутствия в среде бензиламина,  $\beta$ -фенилэтиламина или депренила.

Таким образом, физиологическая роль МАО в мембранах саркоплазматического ретикулула состоит, по-видимому, в том, что она участвует в регуляции активности  $\text{Ca}$ -АТФ-азы. Образуя из аминов, являющихся инертными по отношению к  $\text{Ca}$ -АТФ-азе, альдегиды, которые ингибируют этот фермент, МАО может тем самым снижать активность  $\text{Ca}$ -АТФ-азы. Количество образующихся в саркоплазматических везикулах альдегидов может регулироваться изменением либо активности МАО в мембранах везикул, либо уровня соответствующих исходных аминов в саркоплазме. В литературе описан ряд случаев, когда влияние аминов на биохимические процессы



Торможение активности  $\text{Ca}$ -АТФ-азы субстратами и продуктами моноаминоксидазной реакции.

а — бензиламин (1) и  $\beta$ -фенилэтиламин (2) в отсутствие МАО; б — бензиламин и  $\beta$ -фенилэтиламин в присутствии МАО; в — бензиламин и  $\beta$ -фенилэтиламин в присутствии МАО, предварительно обработанной депренилом (30 мин), г — бензальдегид.

$\text{Ca}$ -АТФ-аза преинкубировалась с аминами, МАО или бензальдегидом 30 мин при комнатной температуре. После преинкубации АТФ-азная реакция инициировалась добавлением 2 mM АТФ и регистрировалась рН-метрически при 25°. Активность  $\text{Ca}$ -АТФ-азы составляла 7,3 мкмоль/мг·мин, концентрация в среде — 3 мг/мл. Активность МАО составляла 1050 ед/мг, содержание в среде — 1 мг/мл. Концентрация бензиламина и  $\beta$ -фенилэтиламина — 2 mM, депренила — 0,1 mM, бензальдегида — 0,2 mM. Приведенные значения средние, полученные в результате 3 опытов.

обуславливается образующимися из них под действием MAO альдегидами [7, 8].

Авторы выражают благодарность проф. В. З. Горкину за постановку темы данной работы и обсуждение результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Татьянаенко Л. В., Райхман Л. М., Горкин В. З. — «Бюлл. exper. биол.», 1977, № 3, с. 283. — 2. Ритов В. Б., Мельгунов В. И., Комаров П. Г. и др. — «Докл. АН СССР», 1977, т. 233, с. 4. — 3. Болдырев А. А., Лебедев А. В., Ритов В. Б. — «Вопр. мед. химии», 1969, т. 15, с. 622. — 4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 5. Veruyovkina I. V., Abdel-Samed M. M., Gorkin V. Z. — «Biochim. biophys. Acta», 1972, v. 258, p. 56. — 6. Веревкина И. В., Якушева М. И. — «Вопр. мед. химии», 1977, т. 23, с. 412. — 7. Gorkin V. Z. — «Pharmacol. Rev.», 1966, v. 18, p. 115. — 8. Gorkin V. Z. — «Adv. Pharmacol. Chemother.», 1973, v. 11, p. 1.

Поступила 8/VIII 1977 г.

#### PARTICIPATION OF MONOAMINE OXIDASE OF THE B TYPE IN REGULATION OF $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ -DEPENDENT ATPase FROM SARCOPLASMIC RETICULUM

L. V. Tat'yanenko, L. M. Raikhman, I. V. Verevkina, N. V. Vasyukova

Aldehydes, formed in oxidative deamination of substrates of the B type monoamine oxidase, inhibited  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase from sarcoplasmic reticulum.

УДК 612.112.015.13

К. Н. Веремеенко, В. М. Лосицкая, О. П. Голобородько,  
Е. С. Костюченко, И. Е. Вишняк

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория биохимии Киевского научно-исследовательского института отоларингологии

*Изучена способность протеолитических ферментов лейкоцитов крови человека расщеплять различные субстраты. В слабощелочной среде (рН 7,6—8,6) гомогенаты лейкоцитов с наибольшей скоростью из белковых субстратов расщепляют щелочной белок протамин, а из синтетических — N-бензоил-DL-аргинин этиловый эфир (БАЭЭ). Протаминрасщепляющая активность угнетается ингибиторами протеназ — трасилолом, овомукоидом и ингибитором трипсина из сои. Последний вызывает наибольший эффект. Ионы тяжелых металлов (Cu, Zn) в значительной степени снижают протеолитическую активность, определяемую по расщеплению протамин и БАЭЭ. Наибольшая протеолитическая активность (субстрат протамин) обнаружена в лизосомальной и микросомальной фракциях лейкоцитов.*

Лейкоциты крови содержат мощную систему протеолитических ферментов, действующих в кислой, нейтральной и слабощелочной среде [1—3]. Изучение ее заслуживает пристального внимания исследователей, так как протеиназы лейкоцитов участвуют в воспалительных и иммунных реакциях, в процессах фагоцитоза [2, 4—8], в регуляции тонуса и проницаемости сосудов [2, 9], процессах свертывания крови и фибринолиза [2, 3, 10—12], в реакциях полимеризации аминокислот и трансамидирования [1].

Для исследования протеолитической активности применяются различные субстраты. Так, протеиназы лейкоцитов гидролизуют естественные белки — казеин и гемоглобин [5, 13—16], альбумин и  $\gamma$ -глобулин [8, 17], фибриноген и фибрин [2, 14], коллаген и эластин [19—22], кининоген [23—25], а также синтетические субстраты: N-тозил-L-аргинин метиловый эфир [4], трет-бутил-оксикарбонил-L-аланин-p-нитрофенол [26] N $\alpha$ -карбобензоксидиглицил-L-аргинил- $\beta$ -нафтиламид [27], L-лейцин-2-нафтиламид и ацетил-DL-фенилаланин- $\beta$ -нафтил [28]. В большинстве ци-

тируемых работ протеолитическая активность лейкоцитов оценивалась на основании применения одного, реже 2—3 субстратов. С целью более углубленного изучения природы протеиназ лейкоцитов крови нами применен комплекс белковых и синтетических субстратов, а также ряд ингибиторов протеолиза.

### М е т о д и к а

Смешанную популяцию белых клеток выделяли из периферической крови здоровых людей. Протеолитическую активность исследовали во взвеси и гомогенатах лейкоцитов, а также их клеточных структурах. Условия выделения клеток из небольшого количества крови (9—12 мл) и гомогенизации их в механическом микроразмельчителе тканей РТ-2 описаны нами ранее. Для разрушения лейкоцитов применяли также детергенты: тритон X-100, Na-дезоксихолат, Na-додецилсульфат (конечная концентрация — 0,1%, длительность воздействия 30 мин при комнатной температуре). Протеолитическую активность во взвеси и гомогенатах лейкоцитов изучали по расщеплению различных субстратов. При кислотном значении рН среды субстратом служил гемоглобин [29]. В слабощелочной зоне в качестве субстратов использовали протамин [30], казеин [31], N-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилид — БАПНА [31], БАЭЭ [32], N-тозил-L-аргинин метиловый эфир — ТАМЭ. При исследовании протеолитической активности по расщеплению протамина время инкубации составляло 1 ч, по гидролизу остальных субстратов — 3 ч. Активность протеиназ лейкоцитов, определяемую по расщеплению гемоглобина и казеина, выражали в микромолях отщепленного тирозина в час на 1 мг белка, БАПНА — в микромолях отщепленного п-нитроанилида в час на 1 мг, протамин — в микромолях образованного аргинина в час на 1 мг; эстеразную активность, выявляемую по гидролизу БАЭЭ и ТАМЭ, — в микромолях расщепленного субстрата в час на 1 мг белка.

Протеолиз в лейкоцитах исследовали также в присутствии ингибиторов протеиназ: трасилола (200 ед.), овомуконда и ингибитора трипсина из сои (200 мкг в пробе), мочевины (конечная концентрация — 1,0 и 2,0 М) и солей двухвалентных металлов (конечная концентрация — 0,001 М). Ингибиторы протеиназ и мочевины предварительно выдерживали с гомогенатом в течение 30 мин при комнатной температуре. Клеточные фракции из гомогенатов лейкоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования. Получали ядерную (750 г), митохондриальную (6000 г), лизосомальную (21 000 г), микросомальную (105 000 г) и растворимую (после 105 000 г) фракции.

Белок в пробах определяли методом Лоури [33]. При изучении протеолитической активности по расщеплению протамин и ТАМЭ в пробу брали 0,1—0,15 мг белка; БАЭЭ — 0,2—0,4 мг; казеина, гемоглобина и БАПНА — 0,3—1,0 мг белка.

В табл. 1—4 приведены средние величины 4—15 опытов, полученные при исследовании лейкоцитов из различных образцов крови.

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

В смешанной популяции белых клеток крови определяли суммарную протеолитическую активность с использованием различных белковых и синтетических субстратов (см. табл. 1). Активность измеряли во взвеси и в го-

Т а б л и ц а 1

Протеолитическая активность лейкоцитов при использовании различных субстратов

Субстрат	рН	Активность, микромоль в час на 1 мг белка ( $M \pm m$ )		
		взвесь	гомогенат	<i>p</i> *
Гемоглобин	3,0	0,17±0,04	0,26±0,03	>0,1
Протамин	7,6	0,21±0,02	0,79±0,11	<0,001
Казеин	7,6	0,14±0,02	0,37±0,006	<0,01
БАПНА	7,6	0	0	—
БАЭЭ	7,8	1,9±0,44	3,8±0,34	<0,01
ТАМЭ	8,6	—	3,1±0,38	—

\**P* — достоверность различий активности во взвеси и в гомогенате лейкоцитов для каждого субстрата.

могенатах лейкоцитов, полученных путем разрушения клеток в механическом микроразмельчителе тканей РТ-2. Обнаружено, что взвесь и гомоге-

наты лейкоцитов доноров обладают протеолитической активностью, выявляемой как в кислой, так и в слабощелочной среде. В гомогенатах лейкоцитов по сравнению с их взвесью обнаружено достоверное повышение активности протеиназ, выявляемой по расщеплению протамина, казеина и БАЭЭ.

Сравнение скорости расщепления ряда естественных и синтетических субстратов в гомогенатах позволило установить, что белки гемоглобин (рН 3,0) и казеин (рН 7,6), которые наиболее часто используются для изучения протеолиза, гидролизуются примерно с одинаковой интенсивностью. Протамин, как это было отмечено ранее, расщепляется протеиназами лейкоцитов, причем скорость гидролиза данного субстрата в гомогенатах лейкоцитов значительно превышает таковую расщепления гемоглобина и казеина (см. табл. 1). Для взвеси лейкоцитов эти различия выражены в значительно

Т а б л и ц а 2

Протаминрасщепляющая и БАЭЭ-эстеразная активность после разрушения лейкоцитов детергентами

Детергент	Активность, микромоль в час на 1 мг белка ( $M \pm m$ )			
	протаминрасщепляющая	<i>P</i> *	БАЭЭ-эстеразная	<i>P</i> *
Взвесь лейкоцитов	0,21±0,02		1,9±0,44	
Тритон X-100	0,86±0,28	<0,05	4,0±0,67	<0,02
Na-дезоксихолат	0,76±0,25	<0,05	4,0±0,55	<0,01
Na-додецилсульфат	0,27±0,07	>0,2	1,9±0,27	

\**P* — достоверность различия по сравнению с соответствующими данными для взвеси лейкоцитов.

меньшей степени. В то же время интенсивность гидролиза гомогенатами лейкоцитов синтетических субстратов БАЭЭ и ТАМЭ, будучи примерно одинаковой, превышала скорость расщепления белковых субстратов в 4—15 раз. В отношении расщепления синтетического субстрата ТАМЭ наши данные для гомогенатов лейкоцитов не совпадают с результатами, полученными другими авторами [4], которые отметили очень слабое расщепление этого субстрата экстрактами гранул лейкоцитов человека.

Из всех исследованных нами субстратов только синтетический субстрат БАПНА не расщеплялся как во взвеси, так и в гомогенатах лейкоцитов. Отсутствие способности нейтральных протеиназ экстрактов гранул лейкоцитов человека и лизосомальной фракции лейкоцитов кролика, полученных из перитонеального экссудата, расщеплять БАПНА было обнаружено также другими авторами [4, 18, 27]. Они считают, что этот факт свидетельствует о нетрипсиноподобной специфичности протеиназ этих клеточных элементов. Наши данные также позволяют предположить, что определяемая в нейтральной среде протеолитическая активность в лейкоцитах человека отличается по специфичности от трипсина.

Для разрушения белых клеток крови, кроме механической гомогенизации, используются некоторые детергенты. Как видно из табл. 2, тритон X-100 и Na-дезоксихолат вызывают повышение как протаминрасщепляющей активности, так и способности расщеплять БАЭЭ. Причем величины активности ферментов при гидролизе двух исследуемых субстратов после разрушения клеток этими детергентами соответственно равны тем, которые были показаны для гомогенатов лейкоцитов, полученных путем механического разрушения (см. табл. 1). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что при исследовании протеолитической активности детергенты тритон X-100 и Na-дезоксихолат не имеют преимуществ по сравнению с разрушением клеток в механическом гомогенизаторе.

При разрушении лейкоцитов Na-додецилсульфатом скорость гидролиза протамин и БАЭЭ не изменяется. Кроме того, этот детергент с частью БАЭЭ образует комплекс, который выпадает в осадок, после чего в пробе остается 83 % субстрата. Осаждается под действием Na-додецилсульфата и часть протамин. Все это позволяет заключить, что данный детергент не может быть использован для разрушения лейкоцитов.

Все остальные исследования были проведены с использованием гомогенатов лейкоцитов, полученных путем разрушения клеток в механическом микроизмельчителе тканей РТ-2.

Исследовали распределение протаминрасщепляющей активности среди отдельных клеточных элементов лейкоцитов (см. табл. 3). Опыты показали, что все изучаемые фракции проявляют способность гидролизовать протамин. Однако скорость этого процесса в отдельных клеточных

Т а б л и ц а 3

Протаминрасщепляющая активность клеточных фракций лейкоцитов

Исследуемая фракция	Активность, наномоль в минуту на 1 мг белка ( $M \pm m$ )
Гомогенат	13,1 ± 1,5
Ядерная	9,6 ± 2,3
Митохондриальная	15,5 ± 2,8
Лизосомальная	26,8 ± 5,0
Микросомальная	25,0 ± 5,5
Растворимая	1,4 ± 0,8

Т а б л и ц а 4

Влияние ионов двухвалентных металлов на протеолитическую и эстеразную активность гомогенатов лейкоцитов доноров (в процентах оставшейся активности от исходной, принятой за 100)

Исследуемые соли	Субстраты	
	протамин	БАЭЭ
MgCl <sub>2</sub>	38	88
CaCl <sub>2</sub>	80	94
BaCl <sub>2</sub>	62	104
CuSO <sub>4</sub>	42	30
ZnCl <sub>2</sub>	26	47
ZnSO <sub>4</sub>	26	50
CoCl <sub>2</sub>	55	92

фракциях различна. Фракции лизосом и микросом расщепляют протамин в наибольшей степени, их удельная активность выше активности гомогената почти в 2 раза. Растворимая фракция гидролизует протамин слабо.

Самая высокая активность в лизосомальной фракции была обнаружена также для эластазы и кишечной пептидазы — специфических протеолитических ферментов, определяемых при нейтральном значении pH среды [19, 24]. Низкая активность нейтральных протеиназ, как и в нашем случае, была показана для растворимой фракции лейкоцитов [16, 19, 24], что обусловлено, по-видимому, наличием в ней ингибиторов протеиназ [17, 28]. Однако при кислом значении pH среды в растворимой фракции рядом авторов была выявлена значительная активность протеолитических ферментов [5, 17, 23].

Мы изучали также действие ионов двухвалентных металлов и ингибиторов протеиназ на протеолитическую активность гомогенатов лейкоцитов.

Согласно полученным результатам (см. табл. 4), ионы легких двухвалентных металлов оказывают различное действие на протаминрасщепляющую и БАЭЭ-эстеразную активности. Так, инкубация гомогенатов лейкоцитов с ионами Mg, Ca и Ba практически не вызывает изменений скорости гидролиза БАЭЭ. Отсутствие влияния ионов Mg и Ca на расщепление синтетического субстрата N $\alpha$ -карбобензоксидиглицил-L-аргинил- $\beta$ -нафтил-амида гомогенатами лейкоцитов также было показано другими авторами [27]. В то же время протаминрасщепляющая активность в присутствии этих ионов снижается. Наиболее сильное угнетение последней вызывают ионы Mg.

Ионы тяжелых металлов Cu и Zn угнетают обе исследуемые активности. На скорость расщепления протамин наиболее сильное угнетающее влияние оказывает Zn<sup>++</sup>, на БАЭЭ-эстеразную активность — Cu<sup>++</sup>. Доказательством того, что наблюдаемое торможение является следствием действия именно ионов металлов, служат опыты с добавлением солей цинка с различными

ми анионами. Как видно,  $ZnCl_2$  и  $ZnSO_4$  в одинаковой степени ингибируют протеолитическую активность, определяемую по гидролизу протамина. Аналогичная картина отмечена и для БАЭЭ-эстеразной активности, однако торможение ее в присутствии этих солей выражено в меньшей степени.

Способность ионов тяжелых металлов  $Cu$  и  $Zn$  оказывать сильное угнетающее действие на протеолитическую активность позволяет предположить, что значительная часть суммарного протеолиза лейкоцитов представлена активностью ферментов, для проявления действия которых необходимы сульфгидрильные группы. Интересно отметить, что ионы цинка значительно угнетают и амидазную активность гомогенатов лейкоцитов [27].

В отличие от ионов меди и цинка кобальта практически не влияет на эстеразную активность и вдвое снижает скорость расщепления протамина гомогенатами лейкоцитов. Это свидетельствует о том, что определяемая протаминрасщепляющая активность не связана с проявлением действия сывороточной карбоксипептидазы В, которая активируется ионами кобальта и способна расщеплять протамин [35].

Для более полной характеристики ферментов протеолиза, выявляемых по расщеплению протамина, мы использовали также ряд природных ингибиторов протеиназ. Как оказалось, исследуемые ингибиторы вызывают угнетение скорости расщепления протамина протеиназами гомогенатов лейкоцитов. Однако их ингибиторный эффект различен. Наиболее сильное влияние на протаминрасщепляющую активность оказывает ингибитор трипсина из бобов сои — он снижает ее на 82%. Наименее выраженное ингибирующее действие оказывает поливалентный калликреин-трипсиновый ингибитор трасилол: при его добавлении к гомогенатам лейкоцитов сохраняется 70% исходной активности. Для овомукоида торможение составляет 48%. Значительное угнетение активности нейтральных протеиназ лизатов лейкоцитов и лизосом соевым ингибитором трипсина было обнаружено ранее при использовании других субстратов [18, 19, 23, 24]; влияние трасилола по сравнению с воздействием соевого ингибитора, как и по нашим данным, было менее значительным [23, 24].

Ингибирующее влияние на скорость гидролиза протамина оказывает также мочевиная. Предварительное выдерживание гомогенатов лейкоцитов с мочевиной в концентрации 1 М снижает протаминрасщепляющую активность на 68%, 2 М мочевиная полностью угнетает эту активность.

Подводя итоги исследований, можно отметить, что гомогенаты лейкоцитов и их структурные компоненты содержат протеолитические ферменты, гидролизующие как белковые, так и синтетические субстраты. Наиболее быстро расщепляемыми субстратами являются N-замещенные эфиры аргинина — ТАМЭ, БАЭЭ и белок протамин. Эти субстраты могут быть рекомендованы для изучения протеолитических ферментов лейкоцитов при различных состояниях, связанных с нарушением системы общего и специфического протеолиза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Трусова Н. Ф., Юлдашев З. У. — «Лаб. дело», 1974, № 2, с. 67.
2. Frydecka I. — «Acta haemat. pol.», 1974, v. 5, p. 73.
3. Rostworowski B. — «Postepy Hig. Med. Dosw.», 1974, v. 28, p. 702.
4. Janoff A., Zelig D. — «Science», 1968, v. 161, p. 702.
5. Weissmann G., Spilberg I., Kraakauer K. — «Arthr. a. Rheum.», 1969, v. 12, p. 103.
6. Weissmann G., Zurier R., Hoffstein S. — «Am. J. Path.», 1972, v. 68, p. 593.
7. Bogdanikowa B., Лукьян Н., Pietruska Z. — «Postepy Hig. Med. Dosw.», 1973, v. 27, p. 469.
8. Gonciarz Z. — «Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci.», 1975, v. 20, № 3, p. 151.
9. Веремеенко К. Н. Киновная система. Киев, 1977.
10. Кузник Б. И., Кузьменко Е. Л. — «Пробл. гематол.», 1971, № 6, с. 32.
11. Кузник Б. И., Русяев В. Ф. — Там же, 1974, № 3, с. 50.
12. Мельников А. Ф., Горшунова Н. К. — «Лаб. дело», 1977, № 2, с. 78.
13. Rindler-Ludwig R., Schmalz F., Graunsteiner H. — «Brit. J. Haemat.», 1974, v. 27, p. 57.
14. Trusz-Gluzza M. — «Acta med. pol.», 1975, v. 16, p. 7.
15. Avila J., Convit J. — «Biochim. biophys. Acta Enzymology», 1973, v. 293, p. 397.

16. Rybicka J. — «Acta med. pol.», 1973, v. 14, p. 305. — 17. Kopitar M., Lebez D. — «Europ. J. Biochem.», 1975, v. 56, p. 571. — 18. Davies P., Ritta G., Krakauer K. et al. — «Biochem. J.», v. 123, p. 559. — 19. Janoff A., Scherer J. — «J. exp. Med.», 1968, v. 128, p. 1137. — 20. Sopata I., Dansewicz A. — «Przegl. lek.», 1974, v. 31, p. 435. — 21. Koj A. — Ibid., 1974, v. 31, p. 425. — 22. Taylor J., Crawford I. — «Arch. Biochem.», 1975, v. 169, p. 91. — 23. Engleman E., Greenbaum L. — «Biochem. Pharmacol.», 1971, v. 20, p. 922. — 24. Movat H., Steinberg S., Haba F. et al. — «Agents a. Actions», 1973, v. 3, p. 284. — 25. Movat H., Haba F., MacMorgine D. — «Int. Arch. Allergy», 1976, v. 50, p. 257. — 26. Janoff A. — «Biochem. J.», 1969, v. 114, p. 157. — 27. Szczekliak A., Teresiak T. — «Acta med. pol.», 1969, v. 10, p. 383. — 28. Davies P., Krakauer K., Weissmann G. — «Nature», 1970, v. 228, p. 761. — 29. Норттроп Д., Курнитц М., Херриотт Р. Кристаллические ферменты. М., 1950, с. 307. — 30. Веремеенко К. И., Погорелова Л. М. — «Лаб. дело», 1973, № 5, с. 287. — 31. Веремеенко К. И. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев, 1971, с. 184, 186. — 32. Brown M. — «J. Lab. clin. Med.», 1960, v. 55, p. 616. — 33. Lowry O., Rosebrough N., Lewis Farr A. et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 34. Corbin N., Hugli T., Müller-Eberhard H. — «Analyt. Biochem.», 1976, v. 73, p. 41.

Поступила 15/VI 1977 г.

#### PROTEOLYTIC ENZYMES IN HUMAN BLOOD LEUKOCYTES

K. N. Veremeenko, V. M. Lositskaya, O. P. Goloborod'ko, E. S. Kostyuchenko, I. E. Vishnyak

Laboratory of Biochemistry, Institute of Otolaryngology, Kiev

Hydrolysis of various substrates by proteolytic enzymes from human blood leukocytes was studied. Among the protein substrates used protamine was hydrolyzed at the highest rate. Among the synthetic substrates — N-benzoyl-D,L-arginine ethyl ester was the one hydrolyzed most rapidly. Effect of native inhibitors of proteinases and of bivalent metal ions on the proteolytic activity in leukocytes was also studied. The highest proteolytic activity, estimated by hydrolysis of protamine, was found in lysosomal and microsomal fractions.

УДК 616-003.83-07:616.153.963'915-074

И. В. Чибисов, И. М. Карманский, В. В. Шеляпина,  
А. Ф. Леонтьев, Е. Л. Розенфельд

#### ЛИПОПРОТЕИДЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ФОРМЕ ГЛИКОГЕНОЗА III ТИПА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Институт педиатрии АМН СССР,  
Москва

*В тканях печени и мышц больной с генерализованной формой гликогеноза III типа, полученных при биопсии, обнаружены значительное накопление аномального по структуре гликогена и отсутствие активности амило-1,6-глюкозидазы. Аномальный по структуре гликоген обнаружен также в эритроцитах больной. Концентрация липопротеидов сыворотки крови, особенно липопротеидов низкой плотности с  $S_f 12-20 S$  и  $0-12 S$ , была увеличена. На фоне внутривенного введения глюкозы и перорального применения холестирамина параллельно клиническому улучшению наблюдалась тенденция к нормализации спектра липопротеидов сыворотки крови.*

Гликогеноз III типа является тяжелым наследственным заболеванием, вызванным отсутствием активности амило-1,6-глюкозидазы и накоплением аномального по структуре гликогена (лимитдекстрина). Активность фермента может отсутствовать в различных тканях. Различают печеночную и мышечную формы гликогеноза III типа [1]. В ряде случаев активность фермента отсутствует как в печени, так и в мышцах и других тканях, что сопровождается особенно тяжелым течением заболевания (генерализованная форма гликогеноза III типа).

В связи с тем, что при гликогенозах наблюдается нарушение не только углеводного, но и жирового обмена, представляло интерес исследовать при этих заболеваниях липопротеиды сыворотки крови. В настоящем сообщении приведены результаты биохимических исследований материала биопсии

печени и мышц, а также крови больной М., 7 лет, с характерными признаками гликогеноза III типа: значительное отставание в росте, резко выраженная гепатомегалия, гипогликемия натощак (15—30 мг/100 мл), гиперхолестеринемия (400—500 мг/100 мл), нормальная концентрация лактата в крови (20—26 мг/100 мл).

### Методика

Ткань печени (20 мг), полученную с помощью игольчатой биопсии, и ткань мышц, полученную путем операционной биопсии (150 мг), немедленно замораживали при  $-78^{\circ}\text{C}$ . В ткани печени определяли активность глюкозо-6-фосфатазы, в ткани печени и мышц — активность фосфорилазы, фосфогексоизомеразы, амило-1,6-глюкозидазы и кислой  $\alpha$ -глюкозидазы [2]. Количество гликогена в печени, мышцах и эритроцитах определяли ферментативным методом с помощью препарата амилоглюкозидазы [3].

Содержание глюкозы в крови определяли с помощью специфического глюкозооксидазного метода. Молочную кислоту в крови находили с помощью п-оксидифенилового реактива. Гликоген из печени и мышц выделяли щелочной обработкой с последующим пересаживанием спиртом. Гликоген эритроцитов выделяли после их обработки ГХУ с последующим диализом безбелкового раствора без осаждения этанолом. О структуре гликогена судили по характеру спектра поглощения его комплекса с йодом.

Липопротеиды низкой и очень низкой плотности (ЛНП и ЛОНП соответственно) выделяли из сыворотки крови больной препаративным ультрацентрифугированием после доведения плотности сыворотки с помощью NaCl до 1,063 г/мл [4]. Всплывшие липопротеиды собирали и подвергали аналитическому ультрацентрифугированию по де Лалла и соавт. [5] для определения концентрации липопротеидов с коэффициентами флотации 100—400 S, 20—100 S, 12—20 S и 0—12 S.

### Результаты и обсуждение

Обследование больной проводили по принятой ранее схеме [5]. После пероральной нагрузки глюкозой (38 г) гликемическая кривая была двугорбой, что часто наблюдается при гликогенозе III типа [6], содержание

Таблица 1

Содержание гликогена (в %) и активность ферментов (в мкмоль P<sup>+</sup> или глюкозы<sup>++</sup> на 1 г ткани/мин) в материале биопсии печени и мышц больной М.

Показатель	Печень		Мышцы	
	больной	норма по данным [2]	больной	норма по данным [2]
Гликоген	12,7	2—6	5,4	0,5—1,5
Глюкозо-6-фосфатаза <sup>+</sup>	2,0	4—15		
Фосфорилаза <sup>+</sup> без АМФ	3,5	15—55		
Фосфорилаза <sup>+</sup> с АМФ			68	60—140
Фосфорилаза <sup>+</sup> с АМФ + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,6	15—55		
Фосфоглюкомутаза	64	25—75	105	25—75
Амило-1,6-глюкозидаза <sup>++</sup>	0	0,4—1,1	0,016	0,3—0,7
Кислая $\alpha$ -глюкозидаза <sup>++</sup>	1,24	0,6—2,4	0,03	0,03—0,15

глюкозы было максимальным (162 мг) на 180-й минуте. Содержание лактата в крови при этом значительно увеличилось (74 мг/100 мл). При нагрузочной пробе с галактозой содержание сахара в крови повышалось только за счет глюкозы, что не характерно для нормы, но характерно для гликогеноза; концентрация лактата при этом резко увеличивалась (до 113 мг/100 мл). Данные, полученные при проведении адреналиновой пробы натощак, были типичными для этого заболевания: концентрация глюкозы и лактата практически не изменялась.

Содержание гликогена в эритроцитах оказалось повышенным (726 мкг на 1 г Hb), а максимум поглощения его комплекса с йодом сдвинут в корот-

коволновую область спектра. Такой характер спектра типичен для аномального по структуре гликогена — лимитдекстрина, образовавшегося при гликогенозе III типа.

Результаты биохимического исследования ткани печени и мышц приведены в табл. 1. Как видно из представленных данных, не только в печени, но и в мышцах больной активность амило-1,6-глюкозидазы практически отсутствует. Кроме того, в печени понижена активность глюкозо-6-фосфатазы и фосфорилазы, что часто бывает при тяжелом течении заболевания. Концентрация гликогена в ткани печени и мышц резко увеличена.

Характер спектра поглощения комплекса гликогена мышц больной с йодом был типичен для лимитдекстрина: его максимум поглощения уста-

Т а б л и ц а 2

Концентрация липопротеидов сыворотки крови больной М. до и во время лечения (в мг/100 мл)

Дата	Лечебные мероприятия	ЛОНП		ЛНП	
		100—400S	20—100S	12—20S	0—12S
25/I 1977 г.	До лечения	69	160	702	789
22/II 1977 г.	Внутривенное введение раствора глюкозы в течение 2 нед	3	19	407	560
4/IV 1977 г.	Внутривенное введение глюкозы и 2-недельный курс холестирамина	12	202	289	596
18/IV 1977 г.	Курс холестирамина	75	268	214	480
Норма по данным [11]		24±18	68±19	39±49	312

новлен при 390 нм в отличие от максимума поглощения комплекса нормального гликогена (490 нм).

Характер спектра поглощения комплекса с йодом полисахарида, выделенного из печени больного, несколько сложнее. Кроме максимума поглощения при 395 нм, имеется максимум поглощения в области 455 нм, что можно объяснить примесью полисахарида с более длинными, чем у лимитдекстрина, наружными ветвями молекул. Присутствие подобного полисахарида возможно из-за низкой активности фосфорилазы в печени.

Таким образом, на основании результатов нагрузочных проб, исследования гликогена эритроцитов и анализа материала биопсии печени и мышц у больной был установлен диагноз генерализованной формы гликогеноза III типа.

Результаты исследования липопротеидов сыворотки крови представлены на рис. 1, см. на вклейке и в табл. 2. Оказалось, что у больной резко повышена концентрация липопротеидов низкой плотности (ЛНП) с  $S_f$  12—20S и 0—12S (702 и 789 мг/100 мл соответственно) и незначительно увеличена концентрация липопротеидов очень низкой плотности (ЛОНП) с  $S_f$  20—100S и 100—400S.

Повышение концентрации липопротеидов в сыворотке крови больной может быть следствием усиленного синтеза в печени триглицеридов и холестерина из углеводов, так как из-за значительного накопления в печени гликогена синтез последнего заторможен. О нарушении синтеза гликогена из гексоз свидетельствуют результаты нагрузок глюкозой и галактозой, показавшие резкое увеличение содержания лактата в крови.

Синтезируемые в печени триглицериды и холестерин постулают в кровь в составе ЛОНП. Что касается ЛНП, то, согласно представлениям, изложенным Эйзенбергом [8], этот класс липопротеидов является продуктом ка-

таболизма ЛОНП. Входящие в состав ЛНП 2 подфракции находятся между собой в метаболических взаимоотношениях, подфракция ЛНП  $S_f$  12—20S является непосредственным метаболическим предшественником подфракции с  $S_f$  0—12 S. Переход между этими подфракциями и катаболизм ЛНП с  $S_f$  0—12 S происходят, по-видимому, в печени [8].

Значительное увеличение содержания обеих подфракций ЛНП при небольшом повышении концентрации подфракций ЛОНП в сыворотке крови больной М. можно объяснить тем, что скорость перехода ЛОНП в ЛНП у нее высокая. Тот факт, что у больной повышена концентрация обеих подфракций ЛНП, может указывать на нарушение перехода ЛНП с  $S_f$  12—20 S в ЛНП с  $S_f$  0—12 S, а также о нарушении распада ЛНП с  $S_f$  0—12 S в печени.

Повторный анализ липопротеидов, сделанный после того, как больная в течение 15 дней получала ежедневно внутривенно глюкозу (300 мл 10% раствора), выявил понижение концентрации ЛОНП и ЛНП. Это можно объяснить тем, что парентерально введенная глюкоза, вероятно, в меньшей степени используется печенью для синтеза липидных компонентов липопротеидов, чем глюкоза, введенная перорально. К этому времени общее состояние больной несколько улучшилось, понизилась кетонемия и несколько уменьшились размеры печени.

Третий анализ липопротеидов был сделан после назначения холестирамина (1 г 3 раза в день) в течение 14 дней вместе с глюкозой. Холестирамин, как известно, усиливает выделение желчных кислот из организма и ускоряет деградацию ЛНП [9]. Четвертый анализ липопротеидов сыворотки крови был сделан еще через 2 нед, в течение которых больная получала только холестирамин (рис. 2, см. на вклейку). При этом было обнаружено снижение концентрации ЛНП (особенно подфракции с  $S_f$  12—20 S) и некоторое повышение концентрации ЛОНП, что могло быть вызвано побочным действием холестирамина [10] или отменой внутривенного вливания глюкозы. К этому времени печень по консистенции стала несколько мягче, ее размеры продолжали уменьшаться, состояние больной улучшалось.

Таким образом, у больной с гликогенозом III типа были выявлены нарушения состава липопротеидов сыворотки крови. На фоне гипохилидемической терапии холестирамином и внутривенным введением глюкозы (последнее у больных с гликогеновой болезнью, по-видимому, можно также отнести к гипохилидемическим мероприятиям) наблюдались улучшение клинической картины заболевания и параллельно с этим нормализация спектра липопротеидов сыворотки крови. Тем не менее кратковременность наблюдения не дает основания для вывода о терапевтическом эффекте холестирамина при лечении гликогеновой болезни.

Авторы выражают благодарность проф. В. О. Шпикитеру и И. А. Поповой за ценные советы при обсуждении настоящей работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Van Hoof F., Hers H. G. — «Europ. J. Biochem.», 1967, v. 2, p. 271—274.
2. Hers H. G. — «Advanc. metab. Dis.», 1964, v. 1, p. 1—44.
3. Huizing F. — «Clin. chim. Acta», 1970, v. 30, p. 567—572.
4. Havel R. G., Eder H. A., Bragdon G. H. — «J. clin. Invest.», 1955, v. 34, p. 1345—1349.
5. De Lalla O. F., Tandy R. K., Loeb H. G. — «Clin. Chem.», 1967, v. 13, p. 85—100.
6. Чибисов И. В. Гликогеновая болезнь. Дис. канд. М., 1975.
7. Чибисов И. В., Леонтьев А. Ф., Розенфельд Е. Л. — «Вопр. мед. химии», 1975, № 2, с. 162—165.
8. Eisenberg S. B. — «Atheroscler. Rev.», 1976, v. 1, p. 23—60.
9. Langer T. R., Levy R. J., Fredrickson D. S. — «Circulation», 1969, v. 40, p. 11—14.
10. Levy R. J. — «J. A. M. A.», 1976, v. 235, p. 2333—2336.
11. Jahneke K., Scholtan W. Die Bluteiweisskörper in der Ultrazentrifuge. Stuttgart, 1960.

Поступила 1/IX 1977 г.

## LIPOPROTEINS OF BLOOD SERUM IN GENERALIZED FORM OF GLYCOGENOSIS TYPE III (LACK OF AMYLO-1,6-GLUCOSIDASE IN LIVER AND MUSCLE TISSUES)

I. V. Chibisov, I. M. Karmansky, V. V. Shelepina, A. F. Leont'ev, E. L. Rosenfeld

Institute of Biological and Medical Chemistry, Institute of Pediatrics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Distinct accumulation of glycogen, anomalous in structure, and absence of amylo-1,6-glucosidase activity were observed in studies of material obtained by biopsy from liver and muscle tissues of a patient with generalized form of glycogenosis type III. Anomalous glycogen (limitdextrin) was also found in erythrocytes. Concentration of lipoproteins, especially of low density lipoproteins 12-20 S and 0-12 S, was increased in blood serum. Spectrum of lipoproteins acquired a tendency to normalization simultaneously with clinical improvement after intravenous administration of glucose and treatment with cholesterolamine per os.

УДК 612.123/.124-087.45

Г. М. Керимов, Н. В. Перова, С. Н. Сучкова,  
И. А. Щербакова, Е. Н. Герасимова, Э. К. Рууге

### ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ ПЛАЗМЫ МЕТОДОМ СПИНОВЫХ МЕТОК

Физический факультет Московского университета им. М. В. Ломоносова, Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

*Структуру липопротеидов (ЛП) плазмы крови мужчин в возрасте 40—59 лет исследовали с помощью метода электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов — иминоксильных производных стеариновой кислоты и андростана. Способ упаковки наружного монослоя липопротеидных частиц, характер межмолекулярных взаимодействий в них сходны с соответствующими характеристиками бислойных биологических и модельных мембран. Обнаружена взаимозависимость между концентрацией в плазме крови ЛП отдельных классов и структурными параметрами распределения зондов в гидрофобной и полярной областях препаратов ЛП. Выявленные закономерности могут быть связаны со способностью ЛП высокой плотности акцептировать холестерин из мембран клеток для переноса в печень и последующего катаболизма, а также со свойством ЛП очень низкой плотности транспортировать холестерин в ткани, в частности, в сосудистую стенку.*

Одной из важных проблем современной медицинской химии является выяснение надмолекулярной организации липидов и белков в липопротеидах (ЛП) плазмы крови.

По плотности, электрофоретической подвижности, размерам частиц, соотношению белковых и липидных компонентов ЛП плазмы крови обычно разделяют на классы: липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП), низкой плотности (ЛПНП) и высокой плотности (ЛПВП). Структура и функции ЛП тесно связаны. ЛПВП обладают способностью акцептировать холестерин с мембран клеток, в частности сосудистой стенки, и транспортировать его в печень — основное место катаболизма холестерина [1, 2]. Напротив, ЛПОНП и ЛПНП транспортируют холестерин в ткани [3]. Нарушение спектра ЛП плазмы с увеличением концентрации ЛПНП и ЛПОНП является фактором, способствующим развитию атеросклеротического повреждения сосудистой стенки, тогда как повышение содержания в плазме ЛПВП рассматривается в настоящее время как антиатерогенный фактор [4].

Нами начато систематическое исследование липидных и белковых компонентов ЛП плазмы крови, а также белок-липидных взаимодействий в липопротеидных частицах с применением метода спиновых меток и зондов. Этот радиоспектроскопический метод нашел за последние 12 лет широкое применение в биохимических и биофизических исследованиях [5—9]. Спиновые метки и зонды — иминоксильные свободные радикалы [10] — позволяют получать сведения о структуре определенных частей биологически важных макромолекул (например, в местах локализации SH-, NH<sub>2</sub>- и COOH-групп), а также модельных и биологических мембран. В первом случае источником информации служат параметры спектров электронного

парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых меток, ковалентно связанных с макромолекулой, во втором — параметры спектров ЭПР гидрофобных зондов, встроенных в липидные части мембран.

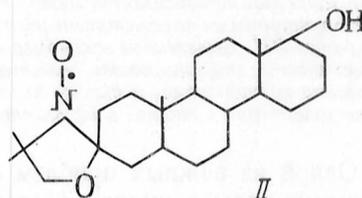
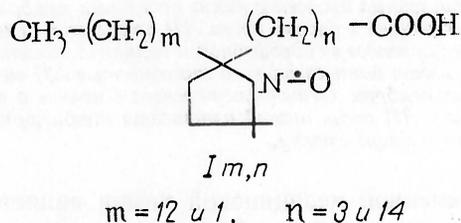
В настоящей статье дается общая характеристика спектров ЭПР, меченных спиновыми зондами ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП, выделенных из плазмы крови с различным содержанием ЛП этих классов. Краткое сообщение о полученных нами результатах опубликовано ранее [11].

### Методика

Исследовали ЛП 32 мужчин в возрасте 40—59 лет. Кровь брали из вены утром через 14—16 ч после последнего приема пищи в пробирки, содержащие сухую ЭДТА—1 мг/мл крови. ЛП плазмы фракционировали посредством препаративного ультрацентрифугирования в солевых растворах определенных плотностей [12] на ультрацентрифуге фирмы «Beckman» (США) модели L-5-50, ротор 40,3, скорость 40 000 об/мин. ЛПОНП выделяли в растворе NaCl плотности  $d=1,006$  г/мл. После снятия верхней фракции, содержащей ЛПОНП, выделяли препараты ЛПНП и ЛПВП последовательным ультрацентрифугированием после доведения плотностей нижних фракций до  $d=1,065$  и  $d=1,21$  г/мл соответственно добавлением сухой соли KBr и растворов NaCl и KBr указанных плотностей. При выделении ЛПОНП и ЛПНП время ультрацентрифугирования составляло 18 ч, температура — 14°C, при выделении ЛПВП время — 24 ч, температура — 17°C. Полученные препараты ЛП исследовали в течение недели после выделения.

О содержании ЛП отдельных классов в плазме крови судили по концентрации холестерина каждого из выделенных классов ЛП в пересчете на 100 мл плазмы [13], а также по данным электрофоретического фракционирования ЛП в полиакриламидном геле. Содержание общего холестерина и триглицеридов в плазме крови определяли на автоанализаторе АЛП фирмы «Technicon» (США).

В качестве спин-метки ЛП использовали производные стеариновой кислоты и андростана, синтезированные фирмой «Syva» (США):



Спиновые зонды вводили в препараты ЛП из концентрированных спиртовых растворов ( $10^{-2}$  М), концентрация зондов в исследуемых образцах была  $10^{-4}$  М. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре E-4 фирмы «Varian» (США), снабженном температурной приставкой. Условия записи спектров были следующими: СВЧ-мощность 20 мВт, ВЧ (100 кГц) модуляция 1 гс, развертка магнитного поля 25 гс/мин при постоянном времени 0,3 с. Спектры ЭПР регистрировали в интервале температур 0—50°C.

Для характеристики локального окружения («микровязкости») спиновых зондов в препарате использовали следующие величины, вычисленные по спектрам ЭПР исследованных ЛП (рис. 1, Б):

1. Время корреляции:

$$\tau = 6,65 \times 10^{-10} \Delta H_{+1} \left( \sqrt{\frac{h_{+1}}{h_{-1}}} - 1 \right) \text{ с,}$$

характеризующее вращательную подвижность зонда.

2. Параметр упорядоченности (порядка):

$$S = \frac{H_{\parallel} - H_{\perp}}{2(A_{zz} - A_{xx})} \frac{a}{a'}$$

$$A_{zz} - A_{xx} = 25 \text{ гс, } a \approx 17 \text{ гс,}$$

$$a' \approx \frac{1}{3} \left( \frac{1}{2} \Delta H_{\parallel} + \Delta H_{\perp} \right) \text{ гс,}$$

где  $A_{zz}$  и  $A_{xx}$  характеризуют так называемое сверхтонкое взаимодействие в инициальном свободном радикале;  $a$  и  $a'$  зависят от полярности окружения  $\text{N} \cdot \text{O}$  фрагмента;  $S$  определяет степень хаотичности движения углеводородных цепей фосфолипидов в препарате.

3. Расстояние между крайними компонентами спектра ( $\Delta H_{II}$ ), а также расстояние от низкопольного компонента до центра среднего компонента спектра ( $\Delta H_I$ ), связанные со скоростью вращательного движения зонда.

4. Параметр  $\Delta V$ , характеризующий распределение зонда между полярной и гидрофобной областью образца.

Для дополнительной характеристики мембранных препаратов применяют проникающий внутрь липидной области реагент — аскорбиновую кислоту [14]. Аскорбат восстанавливает иминокислые радикалы до диамагнитных гидроксиланионов [10]. Кинетика этого процесса (реакция псевдопервого порядка) определяется скоростью как прохождения аскорбата через заряженный слой мембраны, так и диффузии его через гидрофобную область, зависящей от плотности упаковки углеводородных цепей фосфолипидов.

## Результаты и обсуждение

По современным представлениям ЛП состоят из гидрофобного ядра (нейтральные липиды — триглицериды и эфиры холестерина) и внешнего монослоя (полярные липиды — фосфолипиды и холестерин) с вкрапленными в него белковыми компонентами [4]. Это дает основание полагать, что некоторые физико-химические характеристики ЛП (способ упаковки фосфолипидов, их взаимодействие с холе-

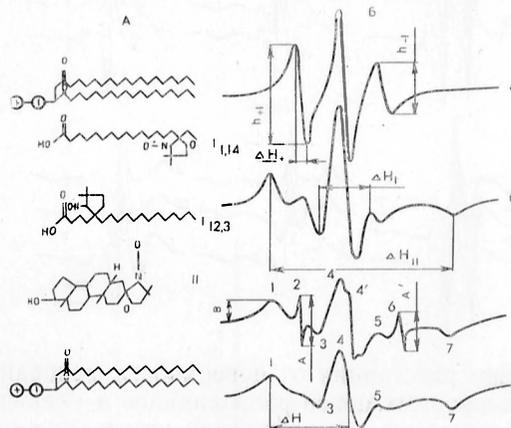


Рис. 1. Схематическое расположение зондов  $I_{m,n}$  и II в фосфолипидном слое (A). Спектры ЭПР слабо (a) и сильно (б, в, г) иммобилизованных спиновых зондов в липопротеидах (B).

Экстремумы 1, 3, 4, 5, 7 соответствуют зонду в гидрофобной области, 2, 4' и 6 — зонду в полярной среде с малой вязкостью.

стеринном и белками, фазовое разделение, фазовые переходы и т. д.) сравнимы с соответствующими характеристиками бислойных биологических и модельных мембран.

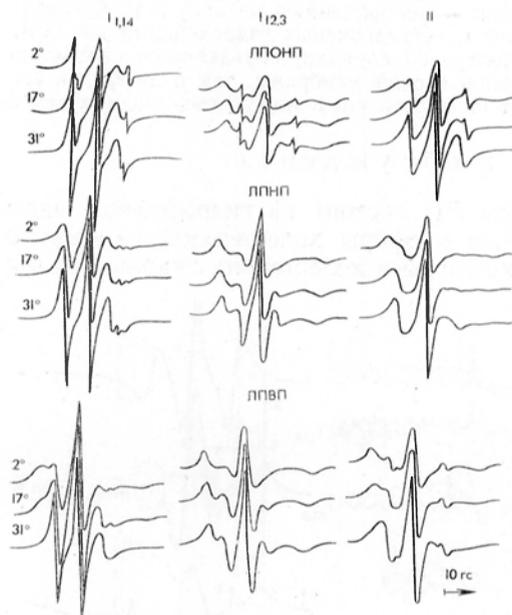
Использованные нами спиновые зонды  $I_{12,3}$ ,  $I_{1,14}$  и II мало растворимы в полярной среде (не более 10 мкмоль на 1 л воды) и хорошо встраиваются в фосфолипидные области биологических мембран [5, 6, 9]. Показано, что зонды  $I_{m,n}$  и II ориентируются в мембранах таким образом, что длинная ось молекулы остается перпендикулярной к поверхности мембраны. При этом карбоксильная группа зонда  $I_{m,n}$  и гидроксильная группа зонда II располагаются вблизи заряженного поверхностного слоя мембраны, а парамагнитное оксоазалидиновое кольцо — в гидрофобном окружении углеводородных цепей фосфолипидов (рис. 1, A). В ряде случаев, однако, часть спиновых зондов локализуется так, что их парамагнитные фрагменты  $>N=O$  могут быстро вращаться, находясь при этом в полярном окружении.

На рис. 2 представлены типичные спектры ЭПР меченных спиновыми зондами  $I_{12,3}$ ,  $I_{1,14}$  и II препаратов ЛП, выделенных из плазмы крови с уровнем ЛП каждого класса, не превышающим границу нормы [15].

Вид спектра ЭПР зонда  $I_{12,3} >N=O$ , фрагмент которого погружен в липиды на небольшую глубину  $\sim 8 \text{ \AA}$  [16], указывает на высокую молекулярную упорядоченность окружения оксоазалидинового кольца зонда, позволяющую ему осуществлять лишь анизотропное вращательное движение.

В табл. 1 приведены параметры, характеризующие вращательное движение зондов  $I_{12,3}$ ,  $I_{1,14}$  и II, локализованных в гидрофобной области липопротеидных комплексов. Как видно из табл. 1,  $(\Delta H_{II})$  и  $S$  для зонда  $I_{12,3}$ , упаковка углеводородных цепей молекул фосфолипидов вблизи полярных головок практически не зависит от класса ЛП, несмотря на боль-

шие различия в размерах ЛП частиц, составе и относительном содержании белковых компонентов. Иная картина наблюдалась для зонда  $I_{1,14}$  с большей глубиной погружения парамагнитного фрагмента в фосфолипидный монослой ( $\sim 22 \text{ \AA}$ ). Кроме того, вид представленных на рис. 2 спектров ЭПР зонда  $I_{1,14}$  свидетельствует о том, что этот зонд иммобилизован значительно слабее, чем  $I_{12,3}$ , особенно в ЛПОНП и ЛПНП, и характер вращения радикала изменяется от почти изотропного к анизотропному в ЛПВП по сравнению с ЛПНП и ЛПОНП.



В опытах со спин-мечеными жирными кислотами установлено [6, 9], что для большинства исследованных мембранных препаратов с увеличе-

Рис. 2. Спектры ЭПР ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП, меченных зондами  $I_{12,3}$ ,  $I_{1,14}$ , II.

Препараты ЛП выделены из плазмы крови со следующим содержанием липидов (в мг/100 мл): триглицериды плазмы 86, холестерин: плазмы — 175, ЛПВП — 44, ЛПНП — 116, ЛПОНП — 15.

нием расстояния от поверхности мембраны повышается подвижность углеводородных цепей фосфолипидов и уменьшается их упорядоченность; такую зависимость мы наблюдали при исследовании ЛПОНП и ЛПНП.

Т а б л и ц а 1

Параметры локального окружения использованных спиновых зондов в ЛП различных классов, выделенных из плазмы крови с нормальными показателями спектра ЛП

Зонд	Показатель	Температура, °С	лпонп	лпнп	лпвп
$I_{12,3}$	S	17	0,73	0,78	0,78
		31	0,64	0,69	0,70
	$H_{\mu}$ , гс	1,5	63,0	62,5	62,8
		17	58,5	58,5	58,8
		31	54,8	55,3	54,8
		31	15,7	15,3	15,3
$II_{1,14}$	$\tau \times 10^9$ , с	1,5	8,7	8,3	9,7
		17	6,3	6,5	5,1
	$\Delta H$ , гс	31	4,5	4,4	4,3
		1,5	22,8	22,8	23,0
II	$\Delta H$ , гс	17	16,5	19,0	21,8
		31	15,3	17,3	17,2
		31	15,3	17,3	17,2

Примечание. Уровень триглицеридов в плазме — 86 мг/100 мл, холестерина: в плазме — 175 мг/100 мл, в ЛПОНП — 15 мг/100 мл, ЛПНП — 116 мг/100 мл и в ЛПВП — 44 мг/100 мл.

В литературе описаны случаи, когда высокая степень упорядоченности углеводородных цепей сохраняется по всей длине молекул фосфолипидов: для родопсинсодержащих бактериальных мембран [17] и для вируса Sindbis [18], что, вероятно, обусловлено специфическим влиянием на фосфоли-

пиды других компонентов мембран — белков и холестерина. Такой вариант был характерен для ЛПВП. Полученные нами для зонда  $I_{m,n}$  данные свидетельствуют о различиях в липид-липидном и белок-липидном взаимодействии в ЛП частицах разных классов, а также о большей погруженности белковых макромолекул в фосфолипидную оболочку в ЛПВП по сравнению с ЛПНП и ЛПОНП.

При использовании нами аскорбиновой кислоты — восстановителя иминоксильных радикалов, оказалось, что, несмотря на примерно одинаковую плотность упаковки молекул полярных липидов в месте локализации  $>N=0$  фрагмента зонда  $I_{12,3}$  в ЛП частицах разных классов, потеря парамагнетизма происходит с разными скоростями. При комнатной температуре время полураспада равно 76,0 для ЛПОНП, 38,5 для ЛПНП и 7,6 для ЛПВП. Это означает, что суммарная величина и распределение зондов на поверхности частиц существенно отличаются у ЛП разных классов. По-видимому, с увеличением относительного содержания белковых компонентов в ЛП более высоких плотностей происходит частичная нейтрализация зарядов фосфолипидов пренарата, вследствие чего аскорбат легче проходит через поверхностный слой частиц.

Другой спиновый зонд, использованный нами — производное андростана (II), — также хорошо встраивается в липидную оболочку ЛП. Длинная ось молекулы этого зонда, вокруг которой происходит вращение оксолидинового кольца, расположена в плоскости стероидного ядра зонда. На рис. 2 видно, что зонд II по степени иммобилизации занимает промежуточное положение между зондами  $I_{12,3}$  и  $I_{1,14}$ . При этом вращательное движение его мало зависело от класса ЛП (см. табл. 1, АН).

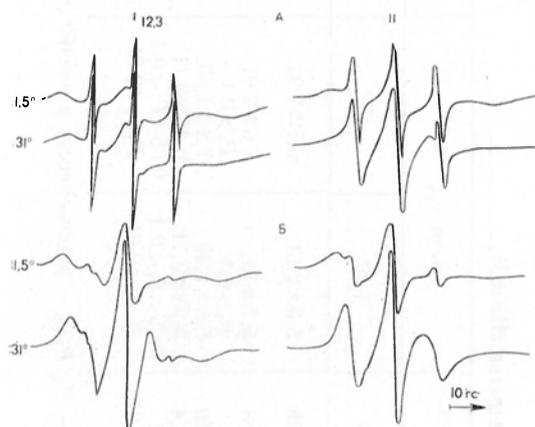
Таблица 2

Распределение зондов в гидрофобной и полярной областях препаратов ЛПОНП

	Содержание липидов в плазме, мг/100 мл		Уровень холестерина в ЛП отдельных классов, в мг/100 мл			Зонд $I_{12,3}$ А/В		Зонд II А/В
	холестерина	триглицеридов	ЛПВП	ЛПНП	ЛПОНП	1,5°	31°	
Норма Гиперальфа- протеидемия	226±17,7	86,7±6,34	43,2±3,45	165±15,8	17,2±1,25	5,5±2,61	6,7±2,92	3,8±1,11
	189±15,6 $P_1 > 0,1$	69,0±13,4 $P_1 > 0,1$	78,0±6,09 $P_1 < 0,01$	97,2±9,76 $P_1 < 0,02$	14,0±2,68 $P_1 > 0,1$	5,7±1,6 $P_1 > 0,1$	7,6±2,01 $P_1 > 0,1$	5,5±1,54 $P_1 > 0,1$
Гипоальфа- протеидемия	207±12,9	77,9±7,63	60,6±7,32	131±15,4	15,6±1,50	5,6±1,42	7,2±1,65	4,7±0,93
	227±24,0 $P_1 > 0,1$ $P_{1+2} > 0,1$	270±57,4 $P_1 < 0,02$ $P_{1+2} < 0,01$	24,5±2,74 $P_1 < 0,01$ $P_{1+2} < 0,01$	149±23,7 $P_1 > 0,1$ $P_{1+2} > 0,1$	54,2±11,4 $P_1 < 0,02$ $P_{1+2} < 0,01$	0,25±0,11 $P_1 < 0,1$ $P_{1+2} < 0,01$	0,45±0,11 $P_1 < 0,1$ $P_{1+2} < 0,01$	0,53±0,20 $P_1 < 0,05$ $P_{1+2} < 0,01$

Примечание.  $P_1$  — достоверность различий со средней арифметической первой группы —  $M_1$ ;  $P_{1+2}$  — достоверность различий со средней арифметической первой и второй групп вместе  $M_{1+2}$ .

Изложенное выше касалось только спектров ЭПР зондов, полностью погруженных в гидрофобную область ЛП частиц. Однако показанные на рис. 1 и 2 спектры представляют собой наложение спектров от зондов, парамагнитные фрагменты которых локализованы в двух областях: гидрофобной и полярной. Например, экстремумы 2, 4 и 6 на рис. 1, в соответ-



ствуют зонду, расположенному в полярной области, а экстремумы 1, 3, 4, 5 и 7 — зонду в гидрофобной области. Для зондов I<sub>1,14</sub> и II отчетливое разделение двух спектров происходит только при температуре <math>< 10^{\circ}\text{C}</math>. При более высоких температурах компоненты спектров

Рис. 3. Спектры ЭПР меченных зондами I<sub>12,3</sub> и II ЛПО, типичные для случаев с гиперальфалиппротеидемией.

(А, холестерин в мг/100 мл; ЛПВП — 96, ЛПО — 12) и с гипоальфалиппротеидемией (Б, холестерин, в мг/100 мл; ЛПВП — 15, ЛПО — 85).

от зондов в гидрофобной и полярной областях перекрываются. Соотношение между этими компонентами при фиксированной температуре зависит от суммарной концентрации зонда в образце. При избытке радикалов в растворе в спектре ЭПР можно заметить вклад синглетного сигнала (см. рис. 2). Это означает, что часть зонда, который сам по себе почти нерастворим в воде, собирается микрокапельками. Из-за сильного магнитного диполь-дипольного взаимодействия спектр ЭПР этих капелек представляет собой уширенный синглет.

Эффект уширения отдельных компонентов спектра за счет магнитного взаимодействия (рис. 1, 2) использовался нами для разделения сигналов зондов в гидрофобном и полярном окружении. Такое разделение было необходимо, например, для вычисления ряда параметров, приведенных в табл. 1. «Полярная» часть спектра уширялась до исчезновения вследствие взаимодействия между зондом и введенным в реакционную смесь парамагнитным «тушителем» ионом феррицианида [7], в то время как часть зонда, локализованная полностью в гидрофобной области, оставалась недоступной феррицианиду.

При исследовании на спин-меченых препаратах ЛП, полученных из плазмы крови лиц с различным содержанием ЛПО, ЛПНП, ЛПВП, обнаружено, что чувствительным параметром, сильно взаимосвязанным со спектром и содержанием в плазме крови ЛП отдельных классов, является распределение молекул зонда между гидрофобной и полярной областью препарата. В наибольшей степени эта взаимосвязанность в наших опытах проявилась при исследовании ЛПО. На рис. 3 показаны спектры ЭПР меченных зондом I<sub>12,3</sub> и II препаратов ЛПО плазмы крови с нормальным спектром ЛП, с увеличением концентрации в плазме ЛПВП, а также с увеличением содержания ЛПО, сопряженным со снижением концентрации ЛПВП. В табл. 2 приведены соответствующие значения параметра распределения А/В. На рис. 3 и в табл. 2 видно, что при повышении содержания ЛПВП в плазме крови (гиперальфалиппротеидемия) существенно изменена структура ЛПО. Фосфолипидная оболочка последних более «плотная», что приводит к резкому увеличению доли зонда в полярной среде. Низкое содержание ЛПВП в плазме крови (гипоальфалиппротеидемия) сопровождается обратным явлением: фосфолипидная оболочка ЛПО «разрыхляется» и зонды I<sub>12,3</sub> и II почти целиком располагаются в

гидрофобной области препарата. При нормальном спектре ЛП плазмы крови наблюдается «промежуточный» вариант.

В табл. 2 приведены параметры распределения А/В зондов  $I_{12,3}$  и II в ЛПОНП при нормальном [13, 15] содержании в плазме ЛПВП (уровень холестерина в ЛПВП составил более 30 мг/100 мл и менее 65 мг/100 мл; в среднем  $43 \pm 3,45$  мг/100 мл), при гиперальфалиппротеидемии (уровень холестерина в ЛПВП выше 65 мг/100 мл; в среднем  $78 \pm 6,09$  мг/100 мл) и гипоальфалиппротеидемии (уровень холестерина в ЛПВП менее 30 мг/100 мл; в среднем  $23 \pm 2,74$  мг/100 мл). Как видно из табл. 2, значения параметра распределения зондов в гидрофобной и полярной областях были близки для нормо- и гиперальфалиппротеидемии. При гипоальфалиппротеидемии и сопровождающей ее повышенной концентрации ЛПОНП (уровень холестерина в ЛПОНП  $54,2 \pm 11,4$  мг/100 мл против  $15,4 \pm 1,5$  мг/100 мл в среднем по первым 2 группам) средний показатель распределения был значительно — в 10—20 раз ниже такового при нормо- и гиперальфалиппротеидемии.

Использованные нами зонды  $I_{m,n}$  и II легко проникали в ЛПНП независимо от спектра и уровня ЛП плазмы крови. Полярная часть в спектрах спин-меченых ЛПНП практически отсутствовала.

Типичные примеры ЭПР-спектров ЛПВП при повышенной и сниженной их концентрации представлены на рис. 4. Оказалось, что снижение концентрации ЛПВП сопряжено с существенным уменьшением эффективного гидрофобного объема ЛП частицы. По всей вероятности, это связано с «уплотнением» фосфолипидной оболочки, в результате чего происходит увеличение доли зонда в полярном окружении. Как было указано выше, при гипоальфалиппротеидемии и сопряженном с ней повышении концентрации ЛПОНП поверхностный слой частиц ЛПОНП оказался, наоборот, разрыхленным. Перераспределение зондов в ЛПВП было, как правило, менее выраженным, чем в ЛПОНП. Однако следует отметить, что основные параметры ( $S$ ,  $\Delta H_{||}$ ,  $\Delta H_{\perp}$ ,  $\tau$ ) спектров ЭПР зондов  $I_{12,3}$ ,  $I_{1,14}$  и II, встроенных в гидрофобные области ЛП частиц, а также доступность этих зондов внешнему парамагнитному «тушителю» (феррицианиду) и химическому восстановителю (аскорбату) весьма мало зависели от наличия гиперлиппротеидемии с увеличением концентрации в плазме того или иного класса ЛП. По-видимому, имеются некоторые различия в структурных характеристиках указанных ЛП комплексов, но их выявление требует дальнейших исследований, в частности, экспериментов с использованием других типов спиновых зондов.

Таким образом, из данных ЭПР-спектроскопии вытекает, что ЛП частицы плазмы крови представляют собой вполне адекватную модель биологических мембран, состоящую из фосфолипидного монослоя, гидрофобно взаимодействующего с ядром ЛП частицы, состоящим из нейтральных липидов. В этом монослое углеводородные цепи образуют более «разрыхленную» область, в то время как вблизи поверхности полярные части молекул фосфолипидов плотно упакованы и сильно ориентированы.

Можно предположить, что обнаруженное нами сопряженное и противоположное изменение характера упаковки поверхностных слоев ЛП частиц

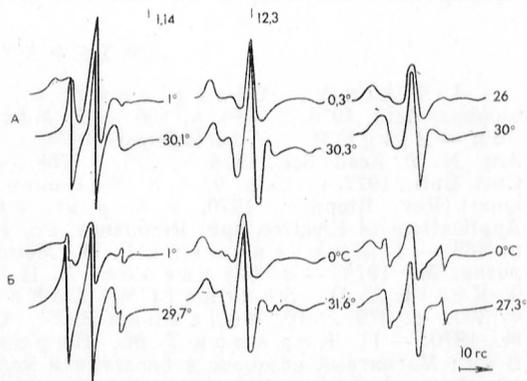


Рис. 4. Спектры ЭПР меченных зондами  $I_{m,n}$  и II ЛПВП, типичные для случаев с гиперальфалиппротеидемией (А, холестерин, в мг/100 мл: ЛПВП — 96, ЛПОНП — 12) и гипоальфалиппротеидемией (Б, холестерин, в мг/100 мл: ЛПВП — 15, ЛПОНП — 85).

при изменении концентрации ЛПОНП и ЛПВП в плазме крови является фактором, влияющим на процесс обмена холестерина ЛП плазмы и клеточных мембран. При этом, возможно, «разрыхленная» упаковка частиц ЛПОНП и более плотная упаковка частиц ЛПВП при гипоальфа-липопротеидемии способствуют переходу холестерина из плазмы в ткани, в частности, сосудистой стенки, а менее плотная упаковка частиц ЛПВП при гиперальфа-липопротеидемии является фактором, улучшающим их способность акцептировать холестерин из клеточных мембран.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Stein Y., Glanlaud M. C., Fainaru M. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1975, v. 380, p. 106. — 2. Miller N. E., Nestel P. J., Clifton — Bligh P. — *Atherosclerosis*, 1976, v. 23, p. 535. — 3. Zilvermit D. B. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1976, v. 275, p. 138. — 4. Havel R. J. — *Cardiovasc. Res. Cent. Bull.*, 1977, v. 15, p. 93. — 5. Mc Connell H. M., McFarland B. G. — *Quart. Rev. Biophys.*, 1970, v. 3, p. 91. — 6. Smith J. C. P. — In: *Biological Applications of Electron Spin Resonance*. Ed. H. M. Swartz et al. New York, 1972, p. 483. — 7. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М., 1974. — 8. Кузнецов А. Н. Метод спинового зонда. М., 1976. — 9. Keith A. D., Shagnoff M., Cohn G. L. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 300, p. 379. — 10. Розанцев Э. Г. Свободные иминоксильные радикалы. М., 1970. — 11. Керимов Т. М., Перова Н. В., Лобова Н. М. и др. — В кн.: *Магнитный резонанс в биологии и медицине*. Черноголовка, 1977, с. 118. — 12. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. — *J. clin. Invest.*, 1955, v. 34, p. 1345. — 13. Friedwald W. T., Levy R. J., Fredrickson D. S. — *Clin. Chem.*, 1972, v. 18, p. 799. — 14. Schreier — Muccillo S., Marsh D., Smith J. C. P. — *Arch. Biochem.*, 1976, v. 172, p. 1. — 15. Fredrickson D. S., Levy R. J. — In: *Metabolic Basis of Inherited Disease*. Ed. J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson. New York, 1972, p. 545. — 16. Jost P., Libertini L. J., Hebert V. E. et al. — *J. molec. Biol.*, 1971, v. 59, p. 77. — 17. Chignell C. F., Chignell D. A. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 62, p. 136. — 18. Sefton B. M., Gaffney B. J. — *J. molec. Biol.*, 1974, v. 90, p. 343.

Поступила 27/IX 1977 г.

#### THE STUDY OF BLOOD SERUM LIPOPROTEINS USING SPIN LABELS

T. M. Kerimov, N. V. Perova, S. N. Suchkova, I. A. Stcherbakova, E. N. Gerasimova,  
E. K. Ruuge

Faculty of Physics, M. V. Lomonosov State University All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Lipoprotein structure was studied by means of EPR-spectroscopy of spin probes — iminoxyl derivatives of stearic acid and of androstane — in blood plasma of 40-59 years old men. The mode of wrapping of external monolayer of lipoprotein particles, the type of their intermolecular interactions were similar to corresponding characteristics of bilayer in biological and model membranes. Correlation was observed between concentration of separate lipoproteins in blood plasma and the structural parameters of the probe distribution in hydrophobic and polar regions of the lipoprotein preparations. The phenomena observed might be related to capacity of the high density lipoproteins to accept cholesterol from cell membranes with transfer of cholesterol into liver tissue, where it is subsequently metabolized, as well as to the property of the very low density lipoproteins to transfer cholesterol into tissues, particularly, into vascular walls.

УДК 616-056.7-02:[616-008.934.54+616-008.939.15]-07

И. В. Цветкова, А. Б. Козина, Е. Л. Розенфельд, Г. Н. Осипова

#### БИОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГАНГЛИОЗИДОЗА ГМ<sub>1</sub>

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Детская клиническая больница № 1, Москва

Исследована активность ряда гликозидаз в лейкоцитах ребенка с подозрением на гликолипидоз. Выявлено резкое понижение активности β-D-галактозидазы и β-D-фукозидазы (менее 10% показателей в контроле) у больного ребенка и понижение активности этих ферментов до 50% показателей в контроле у его родителей. Полученные данные позволили диагностировать у обследуемого ганглиозидоз ГМ<sub>1</sub>.

Ганглиозидозы относятся к группе наследственных заболеваний, передаваемых по аутосомно-рецессивному типу наследования, которые получили общее название гликолипидозов. По клиническим признакам заболеваний этой группы очень сходны. Они протекают по типу психомоторной дегенерации и заканчиваются летально в раннем детском или юношеском возрасте [1]. Лечение этих заболеваний в настоящее время невозможно, однако точный диагноз типа заболевания чрезвычайно важен, поскольку он позволяет проводить пренатальную диагностику при последующих беременностях у женщин с отягощенной по тому или иному гликолипидозу наследственностью. Точная диагностика типа гликолипидоза стала возможна после того, как было установлено, что гликолипидозы являются так называемыми болезнями накопления, при которых отмечается дефект того или иного фермента, участвующего в катаболизме гликолипидов. В результате изменения чаще всего определенной гликозидазы или иной специфической гидролазы нарушается катаболический распад гликолипидов. Это приводит к их накоплению в клетках мозга и паренхиматозных органов, вызывающему резкое нарушение физиологических функций. Дефект ферментов обнаруживается и в клетках амниотической жидкости в случае заболевания плода, на чем основана пренатальная диагностика наследственных гликолипидозов.

Среди ганглиозидозов наиболее часто встречается и лучше всего изучен ганглиозидоз ГМ<sub>2</sub> (болезнь Тея — Сакса), обусловленный недостаточностью N-ацетил-β-D-гексозаминидазы А [1]. В данной работе описан случай биохимической диагностики другого типа ганглиозидоза, клинически сходного с болезнью Тея — Сакса — ганглиозидоза ГМ<sub>1</sub>, или болезни Ландинга, который описал ее в 1964 г. [2]. Ганглиозидоз ГМ<sub>1</sub> обусловлен дефектом β-галактозидазы [3], в результате чего происходит накопление ганглиозида ГМ<sub>1</sub> в мозге и паренхиматозных органах. Выявление недостаточности β-галактозидазы лежит в основе точной диагностики этого заболевания.

Ниже излагаются результаты исследования активности ряда гликозидаз в лейкоцитах ребенка с подозрением на гликолипидоз и в лейкоцитах его родителей.

#### М е т о д и к а

Лейкоциты выделяли из 5—10 мл венозной крови методом, описанным ранее [4]. Водный гомогенат лейкоцитов обрабатывали тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1% и полученный после центрифугирования экстракт использовали в качестве источника фермента. Активность гликозидаз определяли по расщеплению 4-метилумбеллиферил-гликозида (Koch — Light) и выражали в наномолях отщепившегося 4-метилумбеллиферона на

**Активность β-D-галактозидазы и β-D-фукозидазы в лейкоцитах ребенка М. и его родителей (в нмоль/мг/ч)**

Обследуемые	β-D-галактозидаза		β-D-фукозидаза с п-нитрофенилфукозидом
	с метилумбеллиферилгалактозидом	с п-нитрофенилгалактозидом	
Ребенок М.	2,62 (1,5—4,0)	2,35 (1,7—3,0)	0,75 (0,6—0,9)
Мать М.	60 (45—71)	74,5 (85—64)	3,8 (2,8—5,0)
Отец М.	60 (57—63)	60	3,2
Контроль	120 (70—150)	130 (90—170)	7,0 (4,0—10,0)

П р и м е ч а н и е. В скобках указаны пределы колебаний.

1 мг белка экстракта в час. Проба обычно содержала 5—50 мкл экстракта и 100 мкл субстрата в концентрации 1 мМ, приготовленного на 0,1 М цитратно-фосфатном буфере рН 4,5. При определении активности β-D-глокуронидазы использовали ацетатный буфер рН 4,8. После инкубации в течение 1 ч при 37°C к пробам добавляли 5 мл 0,4 М глицинового бу-

фера рН 10,4 и измеряли количество отщепившегося 4-метилумбеллиферона с помощью простого флюориметра, изготовленного на основе фотоколориметра ФЭК-56 [5]. Для определения активности  $\beta$ -D-галактозидазы и  $\beta$ -D-фукозидазы, кроме 4-метилумбеллиферил-гликозидов, использовали также п-нитрофенил- $\beta$ -D-галактозид и п-нитрофенил- $\beta$ -D-фукозид. В последнем случае активность ферментов оценивали по отщеплению пара-нитрофенила, количество которого измеряли с помощью спектрофотометра СФ-4 при 400 нм. Белок определяли по методу Лоури [6].

## Результаты и их обсуждение

Ребенок М., 4 лет, поступил в клинику с явлениями грубого тетрапареза, судорогами тонического характера, косоглазием. До 1 года развивался нормально, затем появились спастические явления в ногах, с 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> лет перестал ходить, нарушилось зрение. В 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> года был предположительно поставлен диагноз метахроматической лейкодистрофии. Анализ активности гликозидаз и арилсульфатазы А (фермента, дефект которого наблюдается при метахроматической лейкодистрофии) дал следующие результаты. Активность  $\beta$ -D-глюкозидазы,  $\alpha$ -D-галактозидазы,  $\beta$ -D-глюкуронидазы,  $\alpha$ -D-маннозидазы,  $\alpha$ -L-фукозидазы и N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы была в пределах величин, соответствующих контролю. Активность формы А N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы составляла 80% общей активности этого фермента, что исключало наличие у ребенка болезни Тея — Сакса. Активность арилсульфатазы А также соответствовала контрольным величинам — 80 нмоль/мг/ч. Нормальные величины колебались от 60 до 170 нмоль/мг/ч (в среднем 85 нмоль/мг/ч). Таким образом, предполагаемый диагноз метахроматической лейкодистрофии не подтвердился. Однако в лейкоцитах ребенка было обнаружено резкое понижение активности  $\beta$ -D-галактозидазы: активность этого фермента составляла примерно 2% нормы (см. таблицу). Это указывало на наличие у ребенка ганглиозидоза GM<sub>1</sub>. Одновременно было обнаружено такое же резкое понижение активности  $\beta$ -D-фукозидазы. Параллельное снижение этих 2 ферментативных активностей при ганглиозидозе GM<sub>1</sub> отмечено в работе Хиндмана [7]. Оно соответствует современным данным о том, что отщепление  $\beta$ -D-галактозильного и  $\beta$ -D-фукозильного остатков катализируется одним ферментом — одной из форм  $\beta$ -D-галактозидазы [8].

Поскольку ганглиозидозы передаются по аутосомно-рецессивному типу наследования, у родителей ребенка активность  $\beta$ -D-галактозидазы и  $\beta$ -D-фукозидазы должна составлять примерно половину таковой в контроле, что подтвердилось в нашем наблюдении. Таким образом, полученные данные позволили заключить, что у ребенка М. имеется наследственный ганглиозидоз GM<sub>1</sub>.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gangliosidoses. — Eds. B. W. Volk and Schneк, Plenum Press, New York and London, 1975. — 2. Landing B. H., Silverman F. N., Craig J. M. et al. — «Am. J. Dis. Child.», 1964, v. 108, p. 503. — 3. Okada S., O'Brien J. S. — «Science», 1968, v. 160, p. 1002. — 4. Цветкова И. В., Козина А. Б. — «Вопр. мед. химии», 1974, № 6, с. 631. — 5. Пеккель В. А. — «Лабор. дело», 1977, № 5, с. 313. — 6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — «J. Biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 7. Hindman C. J., Cottlier E. — «Clin. Chem.», 1972, v. 18, p. 951. — 8. Widderschein G., Prokorenkov A. — «Arch. Biochem.», 1973, v. 158, p. 539.

Поступила 8/VII 1977 г.

## BIOCHEMICAL DIAGNOSIS OF GANGLIOSIDOSIS GM<sub>1</sub>

I. V. Tsvetkova, A. B. Kozina, E. L. Rosenfeld, G. N. Osipova

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Pediatric Hospital 1, Moscow

Activity of several glucosidases was examined in leukocytes of a child in which glycolipidosis was suspected. Distinct decrease in activity of  $\beta$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-fucosidase

(less than 10% of the control level) was found. The enzymatic activities were also decreased in the leukocytes of his parents (down to 50% of the control levels). The data obtained permitted to identify the disease as gangliosidosis GM<sub>1</sub>.

УДК 576.851.315.098.31:577.152.321

Л. К. Шатаева, И. А. Чернова, Г. В. Самсонов, Г. Д. Кобринский,  
В. Д. Соловьев, И. В. Домарадский

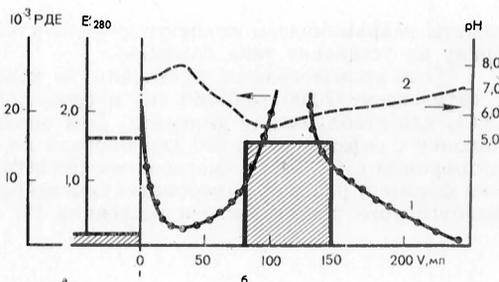
## ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА НЕЙРАМИНИДАЗЫ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Институт высокомолекулярных соединений АН СССР, Ленинград

Описан метод выделения нейраминидазы холерных вибрионов ионообменной сорбцией на карбоксильном катионите Биокарб-Т. Молекулярная масса фермента по данным гелехроматографии на сефадексе G-200 составляет 83 000. По данным малоуглового рентгеновского рассеяния размер макромолекулы нейраминидазы в растворе составляет 5,0 нм.

Нейраминидаза (КФ 3.2.1.18) впервые была обнаружена в культуральной жидкости холерного вибриона [1]. Известно, что, кроме холерных вибрионов, к продуцентам нейраминидазы относятся возбудители многих заболеваний: пневмококки, стрептококки, возбудители газовой гангрены, дифтерии и некоторые другие бактерии. Специфичность действия нейраминидазы заключается в том, что она отщепляет сиаловые кислоты от мо-

Рис. 1. Выделение нейраминидазы из фильтратов холерных вибрионов на карбоксильном катионите биокарб-Т при ступенчатом изменении рН.  
а — сорбция нейраминидазы при рН 5,1;  
б — десорбция 0,1 М фосфатным буфером при рН 7,4.



лекул гликопротеинов, расположенных в слизистой оболочке желудочно-кишечного и дыхательного трактов, а также на поверхности клеточных мембран многих других тканей [2]. По этой и по многим другим причинам нейраминидаза представляет собой особый интерес для ряда химических и медико-биологических исследований [3]. В литературе описано несколько препаративных способов выделения нейраминидазы холерных вибрионов [4, 5], в том числе метод афинной хроматографии [6]. Это весьма трудоемкие многостадийные методы, связанные с использованием дефицитного или дорогостоящего сырья. Нами был разработан более простой метод выделения нейраминидазы холерных вибрионов, основанный на использовании отечественного карбоксильного катионита типа Биокарб [7]. Коммерческие образцы этого ионита, предназначенного для специфической сорбции белков, широко используются для выделения различных ферментов из естественных источников [8].

### Методика

В работе использовали фильтрат культур холерных вибрионов классического биотипа, штамм 569 В Инабо. Выделение проводили на карбоксильном катионите Биокарб-Т производства Олайпенского завода химических реактивов. Катионит использовали в Н<sup>+</sup>-форме в виде зерен размером 0,10—0,16 мм с коэффициентом набухания

в воде 3,5. Через ионообменную колонку с катионитом пропускали фильтрат культур холерных вибрионов при рН 5,1 со скоростью 100 мл/ч/см<sup>2</sup>. При этом нейраминидаза полностью сорбировалась на катионите.

Активность нейраминидазы определяли тиобарбитуровым методом с циклогексаном [9]; в качестве субстрата использовали овомуцин. Результаты выражали в международных единицах активности (МЕ). Для калибровки брали коммерческий препарат нейраминидазы холерных вибрионов фирмы «Calbiochem» с удельной активностью 500 МЕ в 1 мл или 50 мкг белка. Параллельно измеряли активность биологическим методом [10] и выражали в единицах РДЕ. Количество белка в препаратах определяли по методу Лоури [11].

В ряде экспериментов элюаты, полученные с Биокарба-Т, лиофильно высушивали, в связи с чем ферментная активность терялась полностью. Поэтому в дальнейшем

#### Зависимость максимальной активности в пике и выхода по элюции от активности исходного фильтрата

Активность фильтрата, ед. РДЕ/мл	Максимальная активность в пике, ед. РДЕ/мл	Выход по элюции, %
16	128	5,0
128	250	8,0
250	500	13,0
500	1500	27,0
1000	4000	60,0
2000 и выше	8000 ÷ 10 000	72,0

Примечание. Суммарное количество активности, нанесенное на колонку, во всех случаях одинаково.

элюаты нейраминидазы концентрировали ультрафильтрацией через целлюлозную мембрану на установке типа «Амикон».

Гель-хроматографию проводили на колонке с сефадексом G-50 (1,9×50 см) и с сефадексом G-200 (1,6×60 см) в физиологическом растворе с добавлением 0,1% СаСl<sub>2</sub> для стабилизации фермента. Для оценки молекулярной массы нейраминидазы колонку с сефадексом G-200 калибровали по белкам различной молекулярной массы: цитохромом с (13 700), гемоглобином (68 000), γ-глобулином (190 000). Для определения формы и размеров макромолекулы нейраминидазы в растворе использовали метод малоуглового рентгеновского рассеяния [2].

### Результаты и обсуждение

Сорбция нейраминидазы из фильтратов холерных вибрионов на катионите биокарб-Т и последующая десорбция при изменении рН элюирующего раствора представлены на рис. 1; фракции элюата, имеющие нейраминидазную активность, и активность исходного раствора отмечены заштрихованной площадью. Из рис. 1 видно, что предложенный

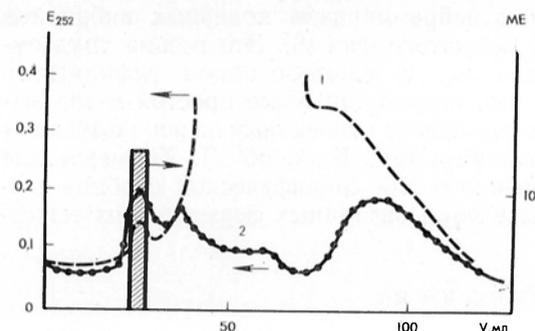


Рис. 2. Гель-хроматография исходного фильтрата холерных вибрионов (1) и концентрированных элюатов (2) на сефадексе G-50.

одностадийный процесс приводит к существенному концентрированию и, кроме того, к увеличению удельной активности нейраминидазы. Однако следует отметить, что активность в пике элюата и суммарный выход нейраминидазы зависят от активности исходного фильтрата (см. таблицу).

Концентрированные с помощью ультрафильтрации элюаты нейраминидазы использова-

ли для получения высокоочищенного ферментного препарата гель-хроматографией на сефадексе G-50 (рис. 2). Из рис. 2 видно, что элюат нейраминидазы, полученный с ионообменной колонки, неомогенен по молекулярной массе. Возможно это связано с частичной инактивацией фермента, так как известно, что нейраминидаза весьма лабильна при обычных методах хранения. На рис. 2 линией 1 представлена гель-хроматография исходного фильтрата холерных вибрионов. Как видно из этого рисунка,

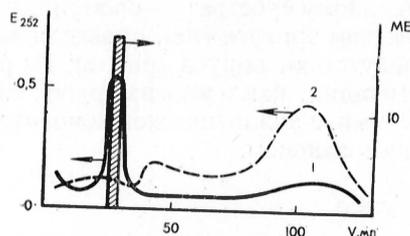


Рис. 3. Гель-хроматография элюатов нейраминидазы на сефадексе G-200. 1 — после концентрирования методом ультрафильтрации; 2 — после лиофильной сушки.

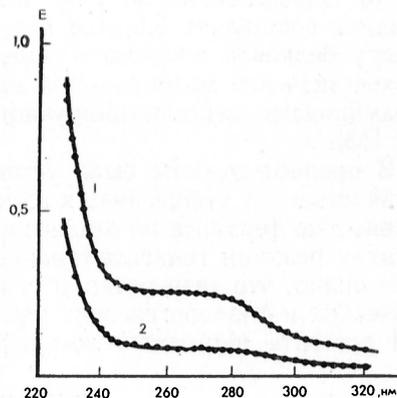


Рис. 4. Спектры УФ-поглощения препаратов нейраминидазы. 1 — выделенный фермент (концентрация 0,105 мг/мл); 2 — коммерческий образец фирмы «Calbiochem» (концентрация 0,05 мг/мл).

в исходном фильтрате содержится незначительное количество высокомолекулярных белков, выходящих с объемом задержки на сефадексе G-50 в тех фракциях, где выходит нейраминидаза. Основные неактивные

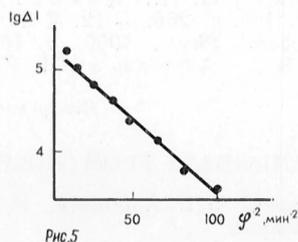


Рис. 5. Определение радиуса инерции нейраминидазы по данным малоуглового рентгеновского рассеяния. I — интенсивность рассеяния под углом  $\phi$  (в мин).

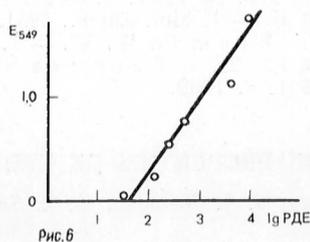


Рис. 6. Определение активности нейраминидазы химическим [9] и биологическим [10] методами.

примеси, которые отделяются при ионообменной очистке нейраминидазы, выходят в области средних и низких молекулярных масс.

На рис. 3 приведены результаты гель-хроматографии активного концентрированного элюата нейраминидазы (кривая 1) и инактивированного в процессе лиофилизации препарата (кривая 2) на сефадексе G-200. Оценка молекулярной массы активной фракции (заштрихованная площадь на рисунке) дает величину  $83\ 000 \pm 5000$ . Кривая 2 показывает, что инактивация нейраминидазы при сушке сопровождается уменьшением высокомолекулярной фракции и увеличением пика низкомолекулярных продуктов, молекулярную массу которых можно оценить как  $13\ 000 \pm 5000$ . Первый, высокомолекулярный пик активного препарата при электрофорезе в полиакриламидом геле при pH 8,9 был гомогенен.

УФ-спектры полученного высокоочищенного препарата нейраминидазы и коммерческого препарата фирмы «Calbiochem» представлены на рис. 4. Как видно на рисунке, эти спектры идентичны.

Из данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей оценены размеры молекулы нейраминидазы в растворе. Линейная зависимость логарифма интенсивности рассеяния  $I$  от квадрата угла рассеяния свидетельствует о достаточно компактной структуре белковой макромолекулы в растворе (рис. 5). Определенный по углу наклона радиус инерции молекулы нейраминидазы составляет  $5,0 \pm 0,3$  нм, что по порядку величины соответствует размеру белковой глобулы с молекулярной массой 83 000. Отметим, что близкое значение молекулярной массы (90 000—94 000) было найдено для нейраминидазы неагглютинирующих вибрионов в работе Вертиева и соавт. [13].

В процессе работы была установлена корреляция между ферментной активностью по отношению к гликопротеидному субстрату—овомуцину и активностью фермента по отношению к клеткам эритроцитов, определяемой по титру реакции гемагглютинации в присутствии вируса (рис. 6). Из рисунка видно, что титр реакции гемагглютинации, как и многих других биологических и физиологических реакций, связан с аналитической концентрацией реагента (фермента) логарифмическим законом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. D z e r n i e k R. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1972, v. 59, p. 35.
2. Enzymes, 1971, v. 5, p. 321. — 3. Соловьев В. Д., Кобринский Г. Д., Гальцева Г. В. и др. — Ж. микробиол., 1975, № 5, с. 94. — 4. Rozenberg A., Winnie B., Chargaff E. — J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, p. 411. — 5. Schramm G., Mohr E. — Nature, 1959, v. 183, p. 1677. — 6. Cuatrecasas P., Illiano G. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1971, v. 44, p. 178. — 7. Самсонов Г. В., Шатаева Л. К., Кобринский Г. Д. и др. — Авт. сл. 542 376, СССР. — 8. Шатаева Л. К., Самсонов Г. В. — Хим.-фарм. ж., 1977, № 11, с. 78. — 9. Aminoff D. — Biochem. J., 1961, v. 81, p. 384. — 10. Соловьев В. Д., Кобринский Г. Д., Домарадский И. В. — Ж. микробиол., 1972, № 10, с. 2. — 11. Lowry Q. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265. — 12. Ritland H. N., Kasberg P., Veeman W. W. — J. chem. Phys., 1950, v. 18, p. 1237. — 13. Вертиев Ю. В., Езепчук Ю. В., Абрашев И. Р. — Биоорганическая химия, 1975, № 1, с. 1639.

Поступила 31/VIII 1977 г.

#### ISOLATION AND PROPERTIES OF NEURAMINIDASE FROM CHOLERA VIBRION

L. K. Shataeva, I. A. Chernova, G. V. Samsonov, G. D. Kobrinsky, V. D. Solov'ev,  
I. V. Domaradsky

Institute of High Molecular Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

A method is described for isolation of neuraminidase from cholera vibriions using ion exchange absorption on carboxyl cationite Biocarb T. Molecular weight of the enzyme, estimated by gel filtration on Sephadex G-200, was about 83000. Diameter of the neuraminidase molecule constituted about 5.0 nm in solution as estimated by the method of small angle X-ray dispersion.

## РЕЦЕНЗИЯ

УДК 612.751.1.015.3(049.3)

В. П. Торбенко, Б. С. Касавина. *Функциональная биохимия костной ткани*. М., «Медицина», 1977, 272 с.

Как и другие разделы биохимии, биохимия костной ткани развивается в последние 10—15 лет чрезвычайно интенсивно. Происходит быстрое накопление фактического материала, разрабатываются и устаревают теоретические концепции. Однако интерес к этим вопросам со стороны биохимиков, работающих в других областях,

недостаточен в силу прочно укоренившегося взгляда на костную ткань как на одну из самых инертных в метаболическом отношении тканей животного организма. Что же касается травматологов-ортопедов, для которых особенно важны прикладные аспекты биохимии костной ткани, то они в своей исследовательской и практической работе по традиции используют преимущественно рентгеноморфологические методы и все еще слабо ориентируются в новейших достижениях биохимии. Рецензируемая книга адресована и травматологам — ортопедам и биохимикам, работающим в других областях. Выход монографии своевременен, так как немногочисленные литературные сведения по биохимии костной ткани, изданные за рубежом, мало доступны, в отечественной же литературе обобщающих работ по этой проблеме мы не нашли.

Монография носит обзорный характер, но содержит много собственных данных авторов. Эти данные представлены почти во всех разделах, они относятся к вопросам углеводного и минерального обмена костной ткани в норме и при некоторых патологических состояниях, динамики гликопротеидов и фермент-субстратных взаимоотношений в процессах онтогенеза и регенерации.

Авторы последовательно излагают материалы по структуре и метаболизму биополимеров органического матрикса кости, по химическому составу и кристаллическому строению минеральных компонентов, по закономерностям минерализации; обсуждается роль гормонов, витаминов и ферментов в обмене веществ костной ткани. Отдельная небольшая глава посвящена возрастным изменениям костей. Подробно рассмотрено влияние некоторых факторов внешней среды — питания, факторов космических полетов (в частности, невесомости и гиподинамии) и облучения — на биохимические процессы в костной ткани. Наиболее обширная последняя глава посвящена локальным и общим изменениям метаболизма при патологических состояниях, затрагивающих костную систему. В этой главе представлены данные о биохимических реакциях, развивающихся в процессе репаративного остеогенеза после перелома кости, о биохимических нарушениях при остеомиелите и ревматоидном артрите, при остеодистрофиях и костных опухолях, приведены новейшие литературные материалы по наследственным заболеваниям, поражающим скелет.

Монография дает целостное представление о современном состоянии биохимии костной ткани. Со всей очевидностью вырисовываются метаболический динамизм костной ткани, ее активное участие в процессах обмена веществ в организме, в первую очередь в обмене соединительнотканых биополимеров (коллагена и гликозаминогликанов) и в минеральном обмене, ее высокая реактивность при различных воздействиях на организм и при многих патологических состояниях.

Монография не лишена недостатков. Слишком лаконична вводная глава, в которой следовало бы конкретнее изложить структуру костной ткани и структурно-функциональную характеристику клеточных элементов, дополнив это изложение соответствующими иллюстрациями; неполнота этих сведений затрудняет восприятие последующих глав. Авторы непоследовательны в применении терминологии белково-углеводных биополимеров. Так, на с. 189 они пишут о том, что термин «мукополисахариды» был заменен термином «гликозаминогликаны», однако далее они часто используют оба эти термина. На с. 189, приводя данные о содержании в ткани костного регенерата гексозаминов, авторы пишут об изменениях «количества гликозаминогликанов», хотя хорошо известно, что гексозамины входят в состав не только гликозаминогликанов, но и гликопротеинов, и сами же авторы (на с. 197) ссылаются на Солхейма, показавшего, что на фракцию гликозаминогликанов приходится лишь  $\frac{2}{3}$  общего количества гексозаминов ткани регенерата.

С дидактической точки зрения было бы правильнее сначала охарактеризовать ферменты костной ткани и только после этого обсуждать роль гормонов и витаминов, поскольку регулирующее влияние последних, как правило, опосредовано ферментами, и именно ферменты служат основной точкой приложения регулирующих воздействий.

В книге содержатся излишние подробности, не имеющие прямого отношения к теме, например подробное описание химической структуры кальцитонина и соматотропного гормона; для соматотропного гормона приведена даже иллюстрация его первичной структуры. Гораздо больший интерес для читателя-биохимика, который легко может найти эти сведения в других источниках, представило бы краткое изложение основных методических подходов к исследованию биохимии костной ткани. В связи с особенностями костной ткани (твердость, высокая концентрация минеральных компонентов) ее биохимический анализ сопряжен со специфическими трудностями, и включение в монографию некоторых методических указаний было бы весьма полезным.

В тексте монографии довольно много опечаток.

Несмотря на отмеченные недостатки, книга В. П. Торбенко и Б. С. Қасавиной, несомненно, заслуживает внимания. Она позволит биохимикам расширить свой кругозор в области биохимии костной ткани и будет способствовать дальнейшему внедрению биохимических идей и методов в травматологию-ортопедию.

Л. И. С л у ц к и й

## СОДЕРЖАНИЕ

- Карелин А. А. Цикло-3', 5'-АМФ в регуляции биосинтеза креатина у млекопитающих: цикло-АМФ-опосредуемая гормональная активация гуанидинацетат- N-метилтрансферазы 435
- Суринов Б. П. Распределение в тканях и некоторые свойства множественных форм кислой фосфатазы 450
- Капиносов И. К. Влияние денервации на углеводный обмен в печени 453
- Сыров В. Н., Курмуков А. Г., Сахибов А. Д. Влияние туркестерона и неробола на активность белоксинтезирующей системы печени мышей 456
- Елаева Н. Л., Стройков Ю. Н. Влияние эзерина на синтез ДНК в печени крысы 461
- Бельченко Д. И., Доманский В. Ю., Ханина Н. Я. Изоферментный спектр и активность некоторых ферментов эритроидных и миелоидных клеток костного мозга кролика и особенности их изменений под влиянием гидрокортизона 464
- Михайлов В. В., Отдельнова Н. Н. Биогенные амины и функциональное состояние печени при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите и постдифтерийном полиневрите у собак 469
- Прашкявичюс А., Лукошявичюс Л., Йокубаускаене В. Н. Ацетилирование сульфаниламида и содержание кофермента А в сердечной мышце и печени при экспериментальном некрозе сердечной мышцы 475
- Сvirnovский А. И., Шиманская Т. В., Левин В. И., Бакун А. В. Нуклеазная активность в лейкозно измененной лимфоидной ткани 479
- Левитова Е. Н., Лобова Н. М. Расщепление липопротеид-липазой фракции липопротеидов очень низкой плотности из сыворотки крови здоровых и больных атеросклерозом людей 483
- Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г., Голубева Л. П., Янишевски Е., Краузе Э. Г., Волленбергер А. Влияние адаптации к высотной гипоксии и холоду на активность аденилциклазы миокарда крыс 486
- Чеснокова Н. П. К вопросу о взаимосвязи активности холинергических процессов с метаболизмом

## CONTENTS

- Karelin, A. A.: Cyclo-3'; 5'-AMP in Regulation of Creatin Biosynthesis in Mammals: Cyclo-AMP-Mediated Hormonal Activation Guanidinacetate-N-Methyl-Transferase
- Surinov, B. P.: Acid Phosphatase: Distribution in Tissues and Some Properties of Multiple Forms of the Enzyme
- Kapinosov, I. K.: Effect of Denervation on Carbohydrate Metabolism in Liver Tissue
- Syrov, V. N., Kurmukov, A. G., Sakhibov, A. D.: Effect of Turkesterone and Nerobole on the Activity of Protein Synthesizing System in Mice Liver
- Elaeva, N. L., Stroj-koff, Yu. N.: Effect of Eserine on DNA synthesis in Rat Liver Tissue
- Bel'chenko, D. I., Domansky, V. Yu., Khanina, N. Ya.: Isoenzyme Spectra and Activities of Several Enzymes from Erythroid and Myeloid Cells of Rabbit Bone Marrow and Patterns of Their Alterations under the Effect of Hydrocortisone
- Mikhailov, V. V., Otdel'nova, N. N.: Biogenic Amines and the Functional State of Dog Liver in Experimental Allergic Encephalomyelitis and Postdiphtheritic Polyneuritis
- Prashkyavichus, A., Lukoshyavichus, L., Yokubauskene, V. N.: Acetylation of Sulfanilamide and Content of Coenzyme A in Heart and Liver Tissue in Experimental Necrosis of Heart Muscle
- Svirnovsky, A. I., Shiman-skaya, T. V., Levin, V. I., Bakun, A. V.: Nuclease Activity in Leukemic Lymphoid Tissue
- Levitova, E. N., Lobova, N. M.: Cleavage of the Fraction of Very Low Density Lipoproteins, Catalyzed by Lipoprotein Lipase, from Blood Sera of Normal People and of Patients with Atherosclerosis
- Meerson, F. Z., Pshennikova, M. G., Golubeva, L. Yu., Yanishevsky, E., Krause, E. G., Vollenberger, A.: Effect of Adaptation to High Altitude Hypoxia and Cooling on Activity of Adenylate Cyclase from Rat Myocardium
- Chesnokova, N. P.: On the Relation Between Activity of Cholinergic Processes and Catecholamine Metabolism

- катехоламинов при ботулинической интоксикации
- 490 Гуркало В. К., Третьяков А. В. Изменения активности моноаминоксидазы, аденилатциклазы и аденозинтрифосфатазы митохондрий клеток печени в процессе гепатокарциногенеза
- 495 Луганова И. С., Блинов М. Н., Абдулкадырова А. С. Возрастной состав эритроцитарной популяции, содержание АТФ и 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах при некоторых формах гемолитических анемий
- 499 Чеснокова Н. П. Влияние активности адренергических процессов на содержание катехоламинов в тканях
- 505 Бышевский А. Ш., Лапушева Т. М., Мухачева И. А. Влияние фосфатидилсерина на образование и лизис фибрина
- 510 Зыкова В. П., Бочкарева Е. В., Владимиров С. С., Беляева Т. Е. Экстракция, разделение и количественное определение простагландинов в плазме крови, тромбоцитах и некоторых тканях
- 514 Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Баскакова Г. М., Ляпина Л. А., Чакалева И. И. Влияние гепарина на концентрацию сахара крови при аллоксановом диабете у крыс
- 520 Карпова О. Б., Обухова Е. Л., Аврова Н. Ф. и Шварц Е. И. Содержание и состав ганглиозидов мозга при болезни Дауна
- 524 Перцева М. Н., Желудкова З. П., Кузнецова Л. А. О взаимодействии цГМФ и цАМФ в их влиянии на углеводный метаболизм мышц
- 528 Гобеев В. Н., Хрипач Л. В., Березов Т. Т. Некоторые биохимические характеристики печени высоко- и низкоракковых линий мышей и первичных спонтанных гепатом
- 533 Климов А. Н., Денисенко А. Д., Зубжицкий Ю. П., Герчикова Е. А. Обнаружение аутоиммунного комплекса липопротеид—антитело в плазме крови и стенке аорты человека
- 539 Цукерман Д. Б., Веревкина И. В., Горкин В. З. Окисление моноаминов в митохондриальной фракции почек быка, катализируемое моноаминоксидазой типа В
- 544 Татьянаенко Л. В., Райхман Л. М., Веревкина И. В., Васюкова Н. В. Участие моноаминоксидазы типа В в регуляции  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимой АТФ-азы саркоплазматического ретикулула
- 548 Веремеенко К. Н., Лосицкая В. М., Голобородько О. П., Костюченко Е. С., Вишняк И. Е. Исследование in Botulinic Intoxication
- 490 Gurkalo, V. K., Tret'yakov, A. V.: Alterations in Activity of Monoamine Oxidase, Adenylate Cyclase and Adenosine Triphosphatase from Rat Liver Mitochondria in Hepatocarcinogenesis
- 495 L u g a n o v a, I. S., B l i n o v, M. N., A b d u l k a d y r o v a, A. S.: Age Composition of Erythrocyte Population and Content of ATP and 2,3-diphosphoglycerate in Erythrocytes Under Some Forms of Hemolytic Anemias
- 499 Chesnokova, N. P.: Effect of Activity of Adrenergic Processes on Content of Catecholamines in Tissues
- 505 Byshevsky, A. Sh., Lapuseva, T. M., Mukhacheva, I. A.: Effect of Phosphatidyl Serine on Formation and Lysis of Fibrin
- 510 Zy k o v a, V. P., B o c h k a r e v, E. V., V l a d i m i r o v, S. S., B e l y a e v a, T. E.: Extraction, Separation and Quantitative Estimation of Prostaglandines in Blood Plasma, Thrombocytes and in some Tissues
- 514 K u d r y a s h o v, B. A., P y t e l, Y u. A., B a s k a k o v a, G. M., L y a p i n a, L. A., C h e k a l o v a, I. I.: Effect of Heparin on Concentration of Blood Sugar in Alloxan Diabetes in Rats
- 520 K a r p o v a, O. B., O b u k h o v a, E. L., A v r o v a, N. F., S h w a r t z, E. I.: Content and Composition of Brain Gangliosides from Patients with Mongolism
- 524 P e r t s e v a, M. N., Z h e l u d k o v a, Z. P., K u z n e t s o v a, L. A.: On the Interaction of cGMP and cAMP and Their Effect on Carbohydrate Metabolism in Muscles
- 528 G o b e e v, V. N., K h r i p a c h, L. V., B e r e s o v, T. T.: Some Biochemical Characteristics of Liver Tissue from Mice of Strains with High and Low Carcinomatosis and of Primary Spontaneous Hepatomas
- 533 K l i m o v, A. N., D e n i s e n k o, A. D., Z u b z h i t s k y, Y u. N.: G e r c h i k o v a, E. A.: Detection of Autoimmune Complex Lipoprotein-Antibody in Human blood Plasma and Aorta Wall
- 539 Z u c k e r m a n, D. B., V e r y o v k i n a, I. V., G o r k i n, V. Z.: Oxidation of Monoamines in Bovine Kidney Mitochondrial Fraction is Catalysed by Type B Monoamine Oxidase
- 544 T a t ' y a n e n k o, L. V., R a i k h m a n, L. M., V e r e v k i n a, I. V., V a s y u k o v a, N. V.: Participation of Monoamine Oxidase of the B Type in Regulation of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -Dependent ATPase from Sarcoplasmic Reticulum
- 548 V e r e m e e n k o, K. N., L o s i t s k a y a, V. M., G o l o b o r o d ' k o, O. P., K o s t y u c h e n k o, E. S., V i s h n y a k, I. E.: Proteolytic En-

- протеолитических ферментов лейкоцитов крови человека . . . . . 550
- Чибисов И. В., Карманский И. М., Шеляпина В. В., Леонтьев А. Ф., Розенфельд Е. Л. Липопротеиды сыворотки крови при генерализованной форме гликогена III типа . . . . . 555
- Керимов Т. М., Перова Н. В., Сучкова С. Н., Щербакова И. А., Герасимова Е. Н., Рууге Э. К. Исследование липопротеидов плазмы методом спиновых меток . . . . . 559
- Цветкова И. В., Козина А. Б., Розенфельд Е. Л., Осипова Г. Н. Биохимическая диагностика ганглиозидоза GM<sub>1</sub> . . . . . 566
- Шатаева Л. К., Чернова И. А., Самсонов Г. В., Кобринский Г. Д., Соловьев В. Д., Домарадский И. В. Выделение и свойства нейраминидазы холерных вибрионов . . . . . 569
- zymes in Human Blood Leukocytes
- Chibisov, I. V., Karman-sky, I. M., Shelepina, V. V., Leont'ev, A. F., Rosenfeld, E. L.: Lipoproteins of Blood Serum in Generalized Form of Glycogenosis Type III (Lack of Amylo-1,6-Glucosidase in Liver and Muscle Tissues)
- Kerimov, T. M., Perova, N. V., Suchkova, S. N., Stcherbakova, I. A., Gerasimova, E. N., Ruuge, E. K.: The Study of Blood Serum Lipoproteins Using Spin Labels
- Tsvetkova, I. V., Kozina, A. B., Rosenfeld, E. L., Osipova, G. N.: Biochemical Diagnosis of Gangliosidosis GM<sub>1</sub>
- Shataeva, L. K., Chernova, I. A., Samsonov, G. V., Kobrinsky, G. D., Solov'ev, V. D., Domaradsky, I. V.: Isolation and Properties of Neuraminidase from Cholera Vibriion

#### Рецензия

- Слуцкий Л. И. Рецензия на книгу В. П. Торбенко, Б. С. Касавиной «Функциональная биохимия костной ткани». М., «Медицина», 1977, 272 с. . . . . 572

#### Book Reviews

- Slutsky, L. J.: A Review of the Book by V. P. Torbenko, B. S. Kasavina «Functional Biochemistry of Bone Tissue»

Техн. редактор *Нечаева Т. В.*

Корректор *Лосой О. А.*

Сдано в набор 16/V 1978 г. Подписано к печати 30/VI 1978 г. Формат бумаги 70×108<sup>1/16</sup>  
печ. л. 9,0 +0,13 печ. л. вкл. (условных 12,78 л.) уч.-изд. л. 13,83 Тираж 2082 экз. Заказ 1188

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