

И. Б. Ронинсон и Б. С. Народицкий

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ДНК ПАПОВА- И АДЕНОВИРУСОВ

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

Разработанные в последние годы методы специфической фрагментации ДНК при помощи рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз) дали возможность исследовать свойства отдельных участков вирусного генома, положение которых на физических картах ДНК известно для большого количества вирусов [3]. Мы рассмотрим результаты, полученные при картировании различных изменений вирусных ДНК, как естественно возникших, так и полученных искусственно; данные об определении РНК, транскрибирующихся на тех или иных участках вирусной ДНК (транскрипционное картирование), и полинуклеотидов, кодируемых этими участками (трансляционное картирование), а также показателей, полученных при изучении последовательностей вирусных ДНК, способных осуществлять трансформацию.

Обозначения рестрикционных эндонуклеаз и рестриктазных фрагментов ДНК даны в соответствии с предложенной номенклатурой [125].

К группе паповавирусов относятся мелкие икосаэдрические вирусы, содержащие ковалентно замкнутую двунитевую молекулу ДНК с молекулярной массой $3-5 \cdot 10^6$. (Название группы возникло как аббревиатура от наименований трех основных представителей этой группы — вирусов папилломы, полиомы и вакуолизирующего обезьяньего вируса 40. В настоящее время термин «Papovaviridae» употребляется как название семейства.) Лучшее изучение относящийся к этой группе обезьяний вирус 40 (SV40). ДНК SV40 стала первой ДНК, для которой была построена физическая карта рестриктазных фрагментов [32]. В настоящее время эта карта настолько детализирована, что на ее основе начато изучение первичной структуры ДНК SV40 [34, 43]. Построены также физические карты ДНК других паповавирусов — вируса полиомы, ВК, человеческой папилломы [25, 41, 49, 52, 65, 124].

К группе аденовирусов относятся сравнительно крупные (около 80 нм в диаметре) вирусы, содержащие линейную двунитевую ДНК с молекулярной массой $20-25 \cdot 10^6$. Физические карты ДНК построены для человеческих аденовирусов типов 2 [102], 3 [31], 5 [102, 110], 6 [2], 12 [62] и обезьяньего аденовируса типа 7 (SA7).

Для папова- и аденовирусов характерны 3 типа взаимодействия с зараженными клетками. При инфекции клеток природного хозяина (пермиссивная система) происходит размножение вируса, сопровождающееся лизисом клеток (продуктивная или литическая инфекция). При заражении клеток не природного хозяина репродукции вируса обычно не происходит (непермиссивная система). Взаимодействие в этом случае сводится либо к временному проявлению в зараженных клетках некоторых вирус-специфических функций (абортивная инфекция), либо к неопластической трансформации клеток [1].

Картирование различных изменений в ДНК. При серийном пассировании перазведенного вируса SV40 были обнаружены молекулы вирусной

ДНК, содержавшие определенные изменения. Эти изменения изучали путем электронно-микроскопического анализа гетеродуплексов, полученных отжигом ДНК выделенных частиц с ДНК исходного штамма SV40 [100]. Этим методом удалось показать, что ДНК возникших эволюционных вариантов SV40 содержала специфические делеции, вставки, дубликации и замещения, причем делеции, как правило, находились в том районе генома, в котором были локализованы поздние гены (см. ниже). Сравнение спектров фрагментов, образующихся при действии различных рестриктаз на ДНК дикого типа SV40 и эволюционных вариантов, выделенных клонированием [19, 98, 99], также подтвердило, что при серийном пассировании возрастает удельный вес последовательностей раннего района по сравнению с последовательностями позднего района, а также происходит включение клеточных последовательностей в ДНК вируса [17, 18, 84, 100, 116]. Были выделены ДНК дефектных частиц, представляющие собой тандемные повторы участка, в котором начинается репликация ДНК, что давало этим молекулам очевидное преимущество при отборе [40, 73, 91, 100]. Возникновение подобных частиц в результате мультипликации небольших молекул ДНК, представляющих собой замкнутые в кольцо сегменты ДНК SV40, было показано экспериментально [33, 55]. Выделенные в этих работах «миникольца» были использованы в качестве векторных молекул для размножения в эукариотических клетках фрагментов ДНК фага λ [56, 103]. Аналогичные результаты были получены при картировании эволюционных вариантов вируса полиомы [49—52].

При исследовании неполных частиц аденовирусов типов 2 и 3 было показано, что многие молекулы содержат дубликации левой части вирусного генома, причем копии дублированного района расположены на обоих концах ДНК неполных частиц и инвертированы одни по отношению к другим [31].

Действие рестриктаз применялось также для получения и анализа искусственных мутантов SV40, содержащих делеции в определенных районах генома [19, 22, 80, 98, 100]. Кроме того, была разработана методика, позволяющая получать вставки поли(дА : дТ) в тех точках ДНК, где действуют те или иные рестриктазы (сайтах рестрикции) [23, 100]. Получение мутаций в определенных районах генома может служить одним из способов изучения функций этих районов.

Для физического картирования мутаций небольшой протяженности в последнее время применяется действие эндонуклеазы S1 *Neurospora crassa*, способной специфически гидролизовать двуниевые ДНК в местах, содержащих неспаренные основания [139]. Действием нуклеазы S1 на гетеродуплексы, образованные нитями ДНК SV40 дикого типа и мутантной ДНК, удалось прокартировать небольшие делеции, обнаружить которые другими методами не удается, а также две мутации, выражающиеся в зависимости от температуры (ts-мутации) [122, 123].

Методы гидролиза гетеродуплексов нуклеазой S1, электронно-микроскопического анализа гетеродуплексов и сравнения рестриктазных фрагментов мутантных ДНК и ДНК дикого типа позволяют картировать мутации, не имеющие фенотипического проявления.

Для физического картирования условно-летальных температурочувствительных мутаций группы наповавирусов был использован метод «спасения маркером», применяющийся для картирования мутантов фага ϕ X174 [66]. Этот метод основан на способности фрагмента ДНК служить праймером в синтезе ДНК на частичном гетеродуплексе, образованном одной нитью ДНК вируса и комплементарной ей нитью этого фрагмента. Эксперимент проводился следующим образом [78]: ДНК ts-мутанта SV40, содержащую разрыв в одной из нитей, смешивали с избытком фрагмента ДНК вируса дикого типа, полученного действием рестриктазы Hind, и отжигали в условиях, когда основным продуктом являлись частичные гетеродуплексы. Затем гетеродуплексами заражали клетки зеленой мартышки

при непермиссивной температуре. В случае, если использованный фрагмент содержал сайт мутации исследуемого вируса, после достраивания частичного гетеродуплекса и его репликации возникали молекулы ДНК вируса дикого типа. Критерием «спасения» служило образование бляшек. Если фрагмент относился к другому району генома, то бляшек не возникало. Этим методом ряд мутаций SV40 был локализован в специфических Hind-фрагментах [78—81]. В ходе работы мутанты первоначально были отнесены к более крупным участкам генома (HpaI-фрагментам), а затем к фрагментам, образованным при действии на HpaI-фрагменты эндорестриктазы Hind.

Для того чтобы установить, насколько близки друг к другу различные пары мутаций, локализованные в одном участке, измеряли инфекционность гетеродуплексов, образованных нитями двух мутантных ДНК. При этом образование вируса дикого типа происходило не в результате рекомбинации между нитями, а зависело от клеточных систем, репарирующих участки с неспаренными основаниями, так как этот эффект не зависел от расстояния между сайтами рекомбинации, если оно превышало некую критическую величину [82].

В связи с трудностями выделения ДНК с молекулярной массой $20 \cdot 10^6$, не содержащих одностранных разрывов, наличие которых приводит при денатурации к фрагментации нитей ДНК, метод «спасения маркером» не использовался для картирования ts-мутаций аденовирусов. В связи с этим применяли иной подход, основанный на анализе генома рекомбинантов между аденовирусом, содержащим ts-мутацию, и другим мутантным аденовирусом, отличающимся от него по спектру рестриктазных фрагментов [63, 119, 140]. Для рекомбинации использовали различные ts-мутанты Ad 5 и гибрида Ad 2⁺ NDI. Температуроустойчивые рекомбинанты между каждой парой ts-мутантов выделяли и подвергали действию различных рестриктаз (эндо-R·EcoRI, эндо-R·BamI, эндо-R·HpaI, эндо-R·SmaI, эндо-R·Hind III). В спектре каждого рекомбинанта идентифицировали фрагменты, характерные для ДНК Ad 5 или Ad 2⁺ NDI. В качестве дополнительного маркера использовали сегмент ДНК SV40, придающий вирусу способность размножаться в клетках зеленой мартышки. Таким способом точки рекомбинации были картированы в пределах определенных рестриктазных фрагментов. Положение ts-мутации определяли по ближайшим точкам рекомбинации с обеих сторон от мутировавшего сайта. Полученные данные сопоставляли с результатами независимого рекомбинационного анализа, проведенного методом трехфакторного скрещивания (по частоте рекомбинаций между парой ts-мутаций и сегментом SV40) [140]. В результате при помощи рестриктаз эндо-R·EcoRI и эндо-R·HpaI удалось грубо локализовать несколько мутаций Ad 5 и Ad 2⁺ NDI. Более тонкое картирование проводили с использованием всех указанных выше фрагментов [119].

При помощи серологического анализа ряда рекомбинантов удалось локализовать на физической карте гены паружных белков аденовирусной частицы — гексона и фибрина [94].

Мутанты аденовирусов, очевидно, могут быть картированы и обработкой гетеродуплексов нуклеазой S1. Таким методом удалось картировать негомлогичные районы ДНК аденовирусов различных типов и разных штаммов аденовируса типа 5 [15, 57]. Однако наличие неспецифических одностранных разрывов, возникающих при выделении аденовирусной ДНК, может затруднить применение этого метода.

Транскрипционное картирование. В целях выяснения направления транскрипции необходимо определить 5'- и 3'-концы обеих нитей ДНК, если она линейна, как у аденовирусов, либо линеаризована действием рестриктазы. Для определения полярности нитей ДНК SV40 в работе [71] воспользовались тем, что РНК-полимераза *E. coli* ассиметрично транс-

крибирует *in vitro* одну нить ДНК SV40 (обозначаемую Е-нитью, в то время как комплементарная ей обозначается как L-нить [138]). Отжигом ДНК SV40 с синтезируемой в этих условиях РНК-копией (кРНК) и последующим отделением гибрида ДНК : РНК от негибридирующей L-нити можно разделить L- и Е-нити ДНК SV40. Для определения полярности ДНК линейаризовали эндо-R·EcoRI. После обработки рестриктазой ДНК деградировали экзонуклеазой III до гидролиза 50% ДНК. После этого 5'-концевые половины обеих нитей были разделены с помощью кРНК. Затем проводили гибридизацию обеих половин с Hind-фрагментами, лежащими по обе стороны фрагмента, который расщепляли рестриктазой эндо-R·EcoRI. 5'-концевая половина Е-нити гибридизировалась с фрагментами Hind-E и Hind-K, а L-нити — с Hind-G и Hind-I. Из этих результатов следует, что транскрипция, происходящая в направлении от 5'- к 3'-концу, направлена на Е-нити по часовой стрелке, а на L-нити — против часовой стрелки на физической карте SV40.

Другой метод определения полярности связан с введением концевой метки после линейаризации и определения тех фрагментов L- и Е-нитей, которые включают метку. Таким образом независимо были определены 3'-концы нитей ДНК SV40 [118] и полиомы [68, 69]. Аналогично устанавливали полярность линейной ДНК аденовируса типа 2 [12]. В этом случае для введения концевой метки не требовалось предварительной обработки рестриктазой.

В ходе продуктивной инфекции папова- и аденовирусами изменяется распределение вирусспецифических мРНК в ядре и цитоплазме зараженных клеток. РНК, синтез которых начинается до репликации вирусной ДНК, обозначаются как ранние РНК, а РНК, синтез которых зависит от репликации ДНК, обозначаются как поздние РНК. Вирусспецифические РНК синтезируются в клеточном ядре, а при транспорте их в цитоплазму происходит процессинг, в ходе которого ядерные РНК подвергаются деградации, 3'-концы полиаденилируются, а 5'-концы приобретают структуру «сар» [97]. После выделения фрагментов ДНК, образованных действием рестриктаз, стало возможным определение участков ДНК, транскрибирующихся на разных стадиях инфекции. Для определения комплементарности РНК тому или иному фрагменту ДНК применяли следующие методы: 1) гибридизация немеченой РНК с мечеными фрагментами и определение количества метки, сорбирующейся на гидроксипатите (ГА); 2) определение количества ДНК, приобретающей после гибридизации устойчивость к нуклеазе *SI N. crassa*; 3) гибридизация РНК с избытком ДНК, денатурированной и иммобилизованной на нитроцеллюлозных фильтрах. К этому методу примыкает другой, в котором ДНК иммобилизуется на сефарозе при помощи бромциана [58]. Из этих методов второй наиболее удобен для анализа матричных функций ДНК, а третий — для препаративного выделения РНК-транскриптов данного фрагмента.

Приблизительная локализация матриц для транскрипции ранней и поздней РНК проведена с использованием фрагментов ДНК SV40, полученных действием эндо-R·HpaI и эндо-R·EcoRI [118]. Более точное картирование было сделано с помощью ферментов эндо-R·HaeIII и эндо-R·Hind [71, 74—76, 134, 136]. В работах [71, 74—76] для гибридизации использовали разделенные Е- и L-нити фрагментов ДНК. Ранняя РНК синтезируется на Е-, а поздняя — на L-нити [87]. Как оказалось, ранняя РНК присутствует в клетках и на поздней стадии [71]. На основании этих работ было установлено, что ранняя РНК SV40 транскрибируется с участка Е-нити, занимающего на физической карте положение 0,175—0,655, а поздняя транскрибируется в противоположном направлении с участка L-нити 0,655—0,175. Следует отметить, что эти данные относятся к цитоплазматической мРНК, так как в ядре транскрипция происходит, причем полностью транскрибируются как L-, так и Е-нити. В ходе процессинга «антиранние» и «антипоздние» последовательности РНК деградируют [78].

Седиментационный анализ цитоплазматической мРНК показал, что вся ранняя РНК представлена фракцией с константой седиментации 19S, а поздняя РНК состоит из двух классов — 19S и 16S [9, 133, 135]. И 16S-, и 19S-поздние мРНК несут матричную функцию, так как они могли быть выделены из полисом [64]. Тем не менее 19S-поздняя РНК является предшественником 16S-РНК и превращается в нее путем специфической эндоили экзонуклеазной деградации [8—10, 134]. Ранние и поздние 16S- и 19S-фракции SV40 — специфической цитоплазматической мРНК были картированы гибридизацией с HaeIII- и HindI-фрагментами ДНК SV40 [72, 95, 134, 136]. Оказалось, что матрицей для синтеза ранней 19S-РНК служит весь ранний район, а для синтеза поздней 19S-РНК — весь поздний район генома SV40. 16S-поздняя РНК картировалась на физической карте в районе 0,945—0,175. Кроме того, была обнаружена минорная фракция 16S поздней РНК, картировавшаяся в районе 0,655—0,945. Эта фракция РНК в отличие от предыдущей не содержала последовательности поли А на 3'-конце и возникла, вероятно, как побочный продукт при процессинге 19S-поздней РНК [72].

Самым точным методом картирования является, безусловно, непосредственное сравнение последовательностей нуклеотидных остатков в РНК и в том участке ДНК, с которого эта РНК транскрибирована. Такое сравнение было проведено для 3'-конца поздней цитоплазматической мРНК SV40 [35]. Последовательность, непосредственно примыкающая к фрагменту поли А, оказалась идентичной определенной последовательности транскрипта L-нити фрагмента Hind-G, полученного *in vitro* при помощи РНК-полимеразы *E. Coli*. Точка, в которой *in vivo* терминируется транскрипция L- и E-нити, была локализована во фрагменте Hind-G на расстоянии 29 нуклеотидных остатков от границы фрагментов Hind-B и Hind-C.

Транскрипционное картирование вируса полиомы проводили гибридизацией вирусспецифической РНК с фрагментами ДНК, полученными действием рестриктаз эндо-R·HpaII, эндо-R·EcoRI и эндо-R·HpaI. Оказалось, что характер транскрипции и процессинга при продуктивной инфекции вирусом полиомы практически не отличается от транскрипции и процессинга SV40 [8, 67, 69, 131]. В работах по определению первичной структуры ДНК SV40 изучена также транскрипция этой ДНК *in vitro* РНК полимеразой *E. coli*. В опубликованных работах представлена нуклеотидная последовательность основного участка, в котором начинается действие полимеразы *E. coli* [35, 36, 142]. Следует отметить, что этот фермент узнает также два других сайта в ДНК SV40 [6], но транскрипция, начинающаяся в участке, локализованном во фрагменте Hind-G, является преобладающей в том случае, если в качестве матрицы используется очищенная ДНК [141]. Однако если в системе используется хроматин из клеток, трансформированных SV40, то преобладает транскрипция, иницирующаяся в других сайтах [12].

В клетках, продуктивно инфицированных аденовирусами (исследования проводились преимущественно на аденовирусе человека типа 2, Ad 2) как на ранней, так и на поздней стадии инфекции, обнаруживались гетерогенные вирусспецифические РНК, среди которых были комплементарные как более тяжелой (H), так и более легкой (L) нити ДНК Ad 2 [61].

Гибридизация с EcoRI-фрагментами ядерных аденовируспецифических мРНК продемонстрировала наличие в ядре крупных предшественников мРНК Ad 2 как на ранней, так и на поздней стадии, гибридизовавшихся с большими участками ДНК каждого из фрагментов, чем цитоплазматические РНК. Аддитивная гибридизация показала, что в ядре происходит симметричная транскрипция некоторых участков вирусного генома [28, 107]. Ядерные аденовируспецифические РНК содержат структуру «сар», но эта структура отличается от той, которая присутствует на 5'-конце аденовируспецифических мРНК, выделяемых из цитоплазмы [97].

Исследование РНК, выделенных из цитоплазмы, показало, что существуют два типа ранней РНК. Концентрация молекул первого типа на поздней стадии инфекции уменьшалась более чем в 16 раз, а РНК второго типа сохраняла постоянную концентрацию на всех этапах. Седиментационный анализ РНК в сочетании с транскрипционным картированием выявил на ранней стадии приблизительно 8 классов ранней РНК (из них 2—3 класса относились к первому типу, 5—6 классов — ко второму), а также примерно 6 классов поздней РНК [27, 127—129].

Транскрипционное картирование Ad 2 проводили гибридизацией РНК с фрагментами, полученными действием эндо-*R*·*EcoRI* [26, 28, 128] или с отдельными Н- и L-нитями этих фрагментов [47, 120]. Более точное картирование проводили с использованием также и рестриктаз эндо-*R*·*HindIII*, *HpaI* и *BamI* [28, 46, 47, 110, 111, 130]. К сожалению, из-за различий в применяемых методах, транскрипционные карты Ad 2, построенные различными группами исследователей, несколько различаются. Тем не менее в своих основных чертах эти карты не противоречат друг другу и дают возможность получить достаточно точные представления о транскрипции и процессинге аденовируспецифических РНК. Основным результатом этих работ является представление о том, что на разных этапах продуктивной инфекции аденовирусом имеет место одновременная транскрипция пространственно разобщенных участков генома, происходящая одновременно в разных направлениях. Эти результаты говорят о наличии весьма сложной системы регуляции синтеза аденовируспецифических РНК на транскрипционном и (или) посттранскрипционном уровнях.

Интересные возможности для изучения регуляции транскрипции представляет низкомолекулярная РНК с константой седиментации 5,5S, синтезирующаяся в клетках, продуктивно инфицированных аденовирусом. Эта РНК состоит из 156 нуклеотидных остатков, последовательность которых была расшифрована [105], содержит на 5'-конце «сар» и транскрибируется *in vivo* РНК-полимеразой III в отличие от предшественников мРНК, транскрибируемых РНК-полимеразой II [137]. Эта РНК была картирована гибридизацией с *EcoRI*-, *HpaI*- и *HindIII*-фрагментами ДНК Ad 2 [108]. 5,5S РНК гибридизировалась с сегментом ДНК, расположенным между точками 0,27 и 0,32 на физической карте генома Ad 2. Следовательно, в этом районе должен располагаться промотор РНК-полимеразы II.

Изучение транскрипции *in vitro* ДНК Ad 2 при помощи РНК-полимеразы из клеток КВ подтвердило наличие контроля на транскрипционном или посттранскрипционном уровне, так как синтезировавшаяся в такой системе РНК, как и РНК, выделявшаяся из ядра при продуктивной инфекции, содержала «антиранние» и «антипоздние» последовательности [13]. Более подробная информация была получена при использовании РНК-полимеразы *E. coli*. В этой системе в основном происходит асимметрическая транскрипция, характер которой можно изменять варьированием условий реакции [83]. В работе [109] синтезировавшаяся *in vitro* РНК была комплементарна 70% L- и 30% Н-нитям ДНК Ad 2. Эта РНК была картирована гибридизацией с отдельными нитями *EcoRI*-фрагментов ДНК. Авторы обнаружили две точки переключения транскрипции с одной нити на другую. В этой же работе электронно-микроскопическими исследованиями были картированы 5—7 точек инициации транскрипции. Однако исследование инициации транскрипции на каждом из *EcoRI*-фрагментов ДНК Ad 2 при помощи ингибиторного анализа [126] показало, что эта ДНК скорее всего содержит один промотор для РНК-полимеразы *E. coli*, с которым может стабильно связываться одновременно несколько молекул фермента. Этот промотор был картирован во фрагменте *EcoRI*-A.

Трансляционное картирование вирусспецифических полипептидов. Определение участков генома, кодирующих те или иные полипептиды, проводится либо трансляцией *in vitro* выделенных из клеток мРНК, положение

которых на физической карте уже установлено, либо использованием определенных рестриктазных фрагментов ДНК в сопряженной бесклеточной системе транскрипции-трансляции.

Поздняя SV40-специфическая РНК использовалась в качестве матрицы в бесклеточной белоксинтезирующей системе зародышей пшеницы [58, 112, 113] и в системах из различных животных клеток [88, 112]. Во всех случаях среди продуктов трансляции удавалось выявить полипептид, который по электрофоретической подвижности, серологической специфичности [88] и пептидным картам [112] совпадал с вирионным белком VP1. В работе [112] использовали в системе отдельно 16S- и 19S-поздние мРНК. Первая из них направляла синтез почти исключительно VP1, вторая кодировала, кроме VP1, и полипептид X несколько меньшего, чем VP1, размера. Вирионные белки VP2 и VP3 в системе не синтезировались. Синтез SV40-специфических полипептидов проводился также транскрипцией-трансляцией фрагментов ДНК SV40, полученных действием различных рестриктаз, в системе, содержащей РНК-полимеразу II и все компоненты системы трансляции зародышей пшеницы [117]. Эта система давала более точные результаты, чем система, содержащая РНК-полимеразу *E. coli* [115]. Было показано, что ген, кодирующий VP1, занимает на физической карте положение приблизительно 0,835—0,175, ген VP2 — положение 0,76—0,00 и ген VP3 — положение 0,853—0,00. Кроме того, известно, что иницирующий кодон для синтеза VP1 находится в точке 0,945 на физической карте ДНК SV40 [43]. Эти результаты следует сопоставить с данными по пептидным картам вирионных белков вируса полиомы [53]. Согласно этим данным, некоторые пептиды являются общими для белков VP2, VP3 и VP1. Следовательно, белки VP2 и VP3 являются продуктами различных путей процессинга некоего полипептида X, кодируемого 19S-поздней мРНК. Основной вирионный белок VP1 синтезируется на моноцистронной матрице с константной седиментации 16S, а также, по-видимому, и на матрице 19S мРНК.

Составление транскрипционно-трансляционных карт генома Ad 2 оказалось возможным ввиду высокой специфичности трансляции вирусных мРНК в бесклеточных системах животного и растительного происхождения. Идентичность продуктов трансляции белкам оболочки аденовируса и внутреннего нуклеопротеида устанавливали электрофорезом в ПАГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) [11], хроматографией на ГА, содержащем ДСН [37], анализом пептидных карт [11, 37, 38], иммунопреципитацией [104]. Некоторые полипептиды нуклеопротеида (VI, VII, VIII) синтезировались в виде предшественников [39, 85, 104], а остальные продукты, синтезированные в присутствии поздних мРНК, полностью соответствовали вирионным белкам. В ряде работ в качестве матрицы использовали отдельные классы мРНК, очищенные центрифугированием в градиенте сахарозы. В работе [38] разные фракции РНК были полностью отделены одна от другой и содержали перекрывающиеся последовательности, что было показано гибридизацией с EcoRI-фрагментами ДНК Ad 2. Поздние мРНК были разделены на три фракции, различающиеся по своей кодирующей способности [104]. В работе [11] транслировались РНК каждого из пиков, возникающих при центрифугировании в сахарозном градиенте. Сопоставление молекулярных масс синтезируемых полипептидов с размерами соответствующих мРНК показало, что по крайней мере некоторые мРНК содержали не более одного цистрона.

Трансляционное картирование как ранних, так и поздних белков Ad 2 проводили трансляцией *in vitro* мРНК, выделенных гибридизацией с рестриктазными фрагментами ДНК Ad 2 [85, 86]. Хотя не все пептиды удалось однозначно отнести к тому или иному фрагменту, в работе удалось картировать гены некоторых белков Ad 2. Полученные результаты не противоречат данным картирования генов структурных белков питей и гексона путем исследования ts-мутантов по этим белкам [94], а также результатам транскрипционного картирования.

Анализ вирусных ДНК в трансформированных клетках. В клетках, трансформированных ДНК-содержащим онкогенным вирусом, вирусная ДНК интегрирована в клеточный геном [4]. Наличие в трансформированных клетках полной генетической информации вируса SV40 или полностью доказывається возможностью индукции из этих клеток инфекционных вирусных частиц [11]. Количество интегрированной вирусной ДНК, приходящееся на одну клетку, изучали в различных экспериментах по гибридизации. Полученные результаты зависели от исследованной клеточной линии и от применявшегося метода гибридизации. Последние результаты говорят о том, что каждая линия трансформированных клеток содержит характерное для нее число вирусного генома на диплоидное количество клеточной ДНК, варьирующее от 2 до 9 [106], или в пределах, близких к этим величинам [30]. Однако, как установлено [16], не все участки генома присутствуют в геноме трансформированных клеток в равных количествах. Методом кинетики реассоциации [16] измеряли количество копий каждого из фрагментов, образуемых при действии на ДНК SV40 эндо-R·EcoRI и эндо-R·HpaI, имеющееся в клетках линии SVT2, трансформированной SV40. Оказалось, что на трансформированную клетку приходится в среднем 6 копий раннего генома и 0,5 копии позднего района.

Использование рестриктаз позволило провести исследование клеточных сайтов, в которые интегрировалась ДНК SV40 [70]. ДНК из 5 независимо трансформированных клеточных линий были фрагментированы эндо-R·HpaII или эндо-R·BamI. Фрагменты были фракционированы в геле и после денатурации *in situ* перенесены на мембранный фильтр. Гибридизация на таких фильтрах ³²P-меченой кРНК SV40 позволила приблизительно определить число фрагментов, в которые была интегрирована вирусная ДНК. Оказалось, что в каждой линии ДНК SV40 включалась в небольшое число фрагментов, но соответствующие наборы фрагментов во всех линиях отличались друг от друга. Следовательно, сайт-специфичность интеграции, по крайней мере в отношении одновременно вирусного и клеточного геномов, отсутствует при трансформации клеток вирусом SV40.

РНК, выделенная из клеток, трансформированных SV40, содержала те же последовательности, что и РНК из продуктивно инфицированных клеток [90].

При использовании для гибридизации отдельных Е- и L-нитей удалось показать, что РНК из трансформированных клеток, так же как и ранняя РНК при продуктивной инфекции, транскрибируется только с Е-нити [77]. Из 11 клеточных линий, трансформированных SV40, лишь в двух наблюдалась очень незначительная транскрипция L-нити. Аналогичные результаты были получены и при исследовании некоторых морфологически ревертантных линий.

Окончательное доказательство транскрипции раннего района в трансформированных клетках было получено при применении для гибридизации рестриктазных фрагментов вирусной ДНК. Так, в работе [16] было показано, что в клетках SVT2 содержится РНК, комплементарная Е-нитям фрагментов HpaI-B и HpaI-C ДНК SV40. РНК из 9 клеточных линий, трансформированных SV40, содержала последовательности, комплементарные Е-нитям фрагментов Hind-A, Hind-H, Hind-I и Hind-B, т. е. полностью совпадала с ранней РНК. В аналогичных исследованиях с вирусом полиомы РНК из трансформированных клеток гибридизировалась с Е-нитями фрагментов раннего района ДНК, в сумме составлявшими около $\frac{1}{3}$ генома [67]. В этом случае не все ранние последовательности транскрибировались в трансформированных клетках.

Вирусспецифическая РНК, выделенная из цитоплазмы трансформированных клеток, как и ранняя РНК, имела константу седиментации 19S [132, 134]. 3'-конец этой РНК был полиаденилирован [134]. Ядерная фракция РНК, как и в случае продуктивной инфекции, была гетерогенной

и содержала крупные молекулы, в том числе превышавшие по размерам вирусный геном [132, 134].

Таким образом, в клетках, трансформированных SV40, транскрибируется ранний район генома. В этом районе локализованы ts-мутации группы А [80, 81]. Как было указано в ряде работ, функция гена А необходима для индукции и поддержания трансформированного состояния клеток [20, 92, 93]. Функция раннего района генома SV40 скорее всего не только необходима, но и достаточна для трансформации. Это было показано в экспериментах по трансформации культур клеток ДНК SV40, обработанной рестриктазами [4, 60]. Трансформацию удалось вызвать при помощи ДНК, линеаризованной либо эндо-R·EcoRI с последующей обработкой нуклеазой SI для удаления липких концов, либо эндо-R·HpaII (линейные молекулы полностью утрачивали инфекционность), а также с помощью фрагментов ДНК SV40, полученных совместным действием эндо-R·EcoPI и эндо-R·HpaII и составляющим по величине $\frac{3}{4}$ генома вируса, и, наконец, фрагментом, полученным действием эндо-R·HpaII и эндо-R·BamHI, составляющим 59% генома и практически совпадающим с ранним районом.

В настоящее время функция раннего генома SV40 выяснена. Этот район кодирует Т-антиген — белок, способный, по-видимому, связываться с вирусной ДНК [24] и инициировать ее репликацию [113]. Возможно, что в трансформированных клетках, когда ДНК SV40 интегрирована в клеточный геном, Т-антиген иницирует репликацию всей ДНК клетки и клеточное деление. Мутанты группы А синтезируют измененный лабильный Т-антиген. Показано, что Т-антиген, синтезируемый в бесклеточной системе, так же как и в трансформированных клетках, имеет молекулярную массу 94 000, но при продуктивной инфекции под действием специфической протеазы он переходит в форму с молекулярной массой 84 000 [24]. Уменьшение молекулярной массы Т-антигена, выделенного из abortивно инфицированных клеток, наблюдалось также при инкубации с экстрактом из пермиссивных клеток [5], в то время как экстракт из непермиссивных клеток не давал такого эффекта. Эти результаты, по-видимому, проливают свет на природу клеточной функции, определяющей характер взаимодействия клетки с онкогенным вирусом. Т-антиген, обнаруживаемый с помощью иммунофлюоресцентной техники, синтезируется при введении в клетки фрагмента эндо-R·HpaII-B, занимающего положение 0,375—0,735 на физической карте ДНК SV40 и составляющего 60% раннего района генома [59]. Однако неизвестно, способен ли этот полипептид индуцировать трансформацию.

В отличие от SV40-трансформированных клеток из клеток, трансформированных аденовирусами, не удавалось индуцировать вирусные частицы. Изучение кинетики гибридизации ДНК трансформированных клеток с EcoRI-, HpaI- и HindIII-фрагментами ДНК Ad 2 и Ad 5 показало, что в 14 линиях содержится сегмент аденовирусной ДНК, занимающий положение 0,00—0,12 на левом конце физической карты. Кроме того, в ряде линий содержались другие последовательности ДНК, различные для каждой линии, но ни одна из них не содержала полного генома аденовируса. Количество копий левого сегмента, приходящееся на диплоидное количество клеточной ДНК, варьировало от 1,6 до 9 [44, 54, 119, 121]. Этот сегмент содержит последовательности, транскрибирующиеся на ранней стадии продуктивной инфекции.

В клетках, трансформированных вирусом Ad 12, который в отличие от Ad 2 и Ad 5 способен вызывать опухоли у животных, наблюдалась иная картина. Гибридизация с EcoRI-фрагментами ДНК Ad 12 показала, что в трансформированных клетках присутствуют все последовательности вирусной ДНК. Однако количество копий каждого фрагмента, приходящееся на диплоидное количество клеточной ДНК, было несколько различным. Аналогичные результаты получены и при анализе ДНК опухолей хомяков, индуцированных Ad 12 [62].

Все последовательности РНК из клеток, трансформированных аденовирусами, присутствуют на ранних стадиях продуктивной инфекции. Транскрипционное картирование проводилось гибридизацией выделенной из трансформированных клеток РНК с отдельными нитями рестриктазных фрагментов ДНК Ad 2. Во всех трансформированных линиях транскрибировались последовательности L-нити левого конца генома от 0,00 до 0,10. Лишь в 2 линиях, в которых были интегрированы другие участки генома, происходила незначительная транскрипция последовательностей правого конца [45, 120]. Более точное картирование проведено с использованием SmaI-фрагментов левого конца генома Ad 2 [14]. Оказалось, что все классы РНК гибридизировались преимущественно с фрагментом, занимающим положение 0,03—0,12 на физической карте, и в меньшей степени — с левым концевым фрагментом. Таким образом, функция сегмента ДНК, расположенного на левом конце генома, оказалась важнейшей для трансформации клеток аденовирусами типов 2 и 5.

То, что функция этого сегмента достаточна для трансформации, было доказано в экспериментах по трансформации клеток фрагментами ДНК Ad 2 и Ad 5. Первоначально ДНК фрагментировали гидродинамически или при помощи ультразвука. Смесь фрагментов вводили в клетки с помощью кальция. Изучая изменение трансформирующей активности в зависимости от среднего размера фрагментов, авторы пришли к выводу, что молекулярная масса трансформирующего участка не превышает 10^6 [60]. При постепенной концевой деградацией ДНК аденовируса, осуществлявшейся последовательной обработкой ДНК экзонуклеазой III и эндонуклеазой SI, трансформирующая активность сохранялась до удаления 1% с каждого из концов, хотя инфекционность ДНК утрачивалась значительно раньше. Эти наблюдения позволили определить положение трансформирующего участка от 0,11 до 0,5—0,6 на физической карте.

Для точного картирования этого района были применены фрагменты левого конца ДНК, образованные при действии эндо-R·EcoRI, эндо-R·HindIII, эндо-R·HpaI и эндо-R·SmaI с размерами (в случае Ad 2) соответственно 58, 7, 4 и 3%. Оказалось, что минимальным фрагментом, способным вызвать трансформацию, является Hind-III-G, занимающий положение 0,00—0,07 на физической карте генома Ad 2 и Ad 5 [60a]. Этот фрагмент имеет молекулярную массу около $1,6 \cdot 10^6$ дальтон и по размерам соответствует приблизительно одному гену.

Фрагменты ДНК аденовирусов способны не только трансформировать клетки в культуре, но и вызывать опухоли у животных. Это было доказано в экспериментах по индукции опухолей у поворожденных хомячков ДНК обезьяньего аденовируса SA7, фрагментированной гидродинамически [96], либо рестриктазами эндо-R·HpaI или эндо-R·EcoRI [21]. В последнем случае онкогенностью обладал лишь более крупный из двух фрагментов, образованных эндо-R·EcoRI.

Функция гена, ответственного за трансформацию, вероятно, будет выяснена в ближайшее время. Согласно данным трансляционного картирования [86], этот ген кодирует ранний белок с молекулярной массой 44 000. Можно предположить, что этот белок, так же как и T-антиген наповавирусов, принимает участие в репликации ДНК. Таким образом, специфическая фрагментация ДНК онкогенных вирусов позволила выйти на новый этап исследования механизмов вирусного канцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зильбер Л. А., Ирлин И. С., Киселев Ф. Л. Эволюция вирусогенетической теории возникновения опухолей. М., 1975.
2. Народицкий Б. С., Карамов Э. В., Чаплыгина Н. М. и др. — *Вопр. вирусол.*, 1976, № 5, с. 537.
3. Ронинсон И. Б., Народицкий Б. С. — *Вопросы вирусологии*, 1978, № 4, с. 401.
4. Abrahams P., Mulder C., Van De Voort A. et al. — *J. Virol.*, 1975, v. 16, p. 818.
5. Ahmad-Zadeh S.,

Allet B., Greenblatt J. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 1097. — 6. Allet B., Roberts R. G., Gesteland R. F. et al. — Nature, 1974, v. 49, p. 217. — 7. Aloni Y. — Nature, New Biol., 1973, v. 243, p. 2. — 8. Aloni Y. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1975, v. 39, p. 165. — 9. Aloni Y. — FEBS Letters, 1975, v. 54, p. 363. — 10. Aloni Y., Shanim, Reuveni I. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 2587. — 11. Anderson C. W., Lewis J. B., Atkins J. F. et al. — Ibid., 1974, v. 71, p. 2756. — 12. Astrin S. M. — Biochemistry (Wash.), 1975, v. 14, p. 2700. — 13. Austin G. E., Bello L. G., Furth J. J. — Fed. Proc., 1973, v. 32, p. 461. — 14. Bachenheimer S., Darnell J. E. — J. Virol., 1976, v. 19, p. 286. — 15. Bartok K., Garon C. F., Berry K. W. et al. — J. molec. Biol., 1974, v. 87, p. 437. — 16. Botchan M., Osanne B., Sambrook J. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1975, v. 39, p. 95. — 17. Brockman W. W., Gutai M. W., Nathans D. — Virology, 1975, v. 66, p. 36. — 18. Brockman W. W., Lee T. N., Nathans D. — Ibid., 1973, v. 54, p. 384. — 19. Brockman W. W., Nathans D. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 942. — 20. Brugge J. S., Butel J. S. — J. Virol., 1975, v. 15, p. 619. — 21. Burnett J. P., Mayne N., Helton L. — Nature, 1975, v. 254, p. 158. — 22. Carbon J., Shenk T. E., Berg P. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 1392. — 23. Carbon J., Shenk T. E., Berg P. J. — J. molec. Biol., 1975, v. 98, p. 1. — 24. Carroll R. B., Smith A. E. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 2254. — 25. Chen M. C. Y., Chang K. S. S., Salzman N. P. — J. Virol., 1975, v. 15, p. 191. — 26. Craig E. A., McGrogan M., Mulder C. et al. — Ibid., 1975, v. 16, p. 905. — 27. Craig E. A., Raskas H. J. — Ibid., 1974, v. 14, p. 751. — 28. Craig E. A., Tal J., Nishimoto T. et al. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1975, v. 39, p. 483. — 29. Craig E. A., Zimmer S., Raskas H. J. — J. Virol., 1975, v. 15, p. 1202. — 30. Croce C. M., Huebner K., Girardi A. J. et al. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1975, v. 39, p. 335. — 31. Daniell E. — J. Virol., 1976, v. 19, p. 685. — 32. Danna K. J., Sack G. H., Nathans D. — J. molec. Biol., 1973, v. 78, p. 363. — 33. Davoli D., Fareed G. C. — Nature, 1974, v. 251, p. 153. — 34. Dhar R., Subramanian K., Zain B. S. et al. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1975, v. 39, p. 153. — 35. Dhar R., Weissman S. M., Zain B. S. et al. — Nucl. Acids. Res., 1974, v. 1, p. 595. — 36. Dhar R., Zain S., Weissman S. M. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 71, p. 371. — 37. Eron L., Callahan R., Westphal H. — J. biol. Chem., 1974, v. 14, p. 375. — 38. Eron L., Westphal H. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 3385. — 39. Eron L., Westphal H., Callahan R. — J. Virol., 1974, v. 13, p. 375. — 40. Fareed G. C., Byrne J. C., Martin M. A. — J. molec. Biol., 1974, v. 87, p. 275. — 41. Favre M., Orth J., Croissant O. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 4810. — 42. Fiers W., Danna K. J., Rogiers R. et al. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1975, v. 39, p. 179. — 43. Flint S. J., Berge T. S. M., Sharp P. A. — Virology, 1976, v. 72, p. 443. — 44. Flint S. J., Gallimore P. H., Sharp P. A. — J. molec. Biol., 1975, v. 96, p. 47. — 45. Flint S. J., Sambrook J., Williams J. F. et al. — Virology, 1976, v. 72, p. 456. — 46. Flint S. J., Wewerka-Lutzl, Levine A. S. et al. — J. Virol., 1975, v. 16, p. 662. — 47. Folk W. R., Fishel B. R. — Virology, 1975, v. 64, p. 447. — 48. Folk W. R., Fishel B. R., Anderson D. M. — Ibid., 1975, v. 64, p. 277. — 49. Folk W. R., Wang H. C. E. — Virology, 1974, v. 61, p. 140. — 50. Fried M. — J. Virol., 1974, v. 13, p. 939. — 51. Fried M., Griffin B. E., Lund E. et al. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1975, v. 39, p. 45. — 52. Friedman T. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 257. — 53. Gallimore P. H., Sharp P., Sambrook J. — J. molec. Biol., 1974, v. 80, p. 249. — 54. Ganem D., Nussbaum A. L., Davoli D. et al. — Ibid., 1976, v. 101, p. 57. — 55. Ganem D., Nussbaum A. L., Davoli D. et al. — Cell, 1976, v. 7, p. 349. — 56. Garon C. F., Berry K. W., Hierholzer J. C. et al. — Virology, 1973, v. 54, p. 414. — 57. Gilboa E., Prives C. L., Aviv H. — Biochemistry (Wash.), 1975, v. 14, p. 4215. — 58. Graessman A. L., Graessman M., Robric R. et al. — FEBS Letters, 1976, v. 61, p. 81. — 59. Graham F. L., van der Eb A. J., Heijneker H. L. — Nature, 1974, v. 251, p. 687. — 60. Graham F. L., Abrahams P. J., Mulder C. et al. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1975, v. 39, p. 637. — 61. Green M. — Ann. Rev. Biochem., 1970, v. 39, p. 701. — 62. Green M. R., Chinnadurai G., Mackey J. K. et al. — Cell, 1976, v. 7, p. 419. — 63. Grodzicker T., Williams J., Sharp P. et al. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., v. 39, p. 439. — 64. Hohen A. — Virology, 1975, v. 67, p. 588. — 65. Howley P. M., Khoury G., Byrne J. C. et al. — J. Virol., 1975, v. 16, p. 959. — 66. Hutchison C. A., Edgell M. N. — Ibid., 1971, v. 8, p. 181. — 67. Kamen R., Lindstrom D. M., Shure H. et al. — Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1975, v. 39, p. 187. — 68. Kamen R., Sedat J., Ziff E. — J. Virol., 1975, v. 17, p. 212. — 69. Kamen R., Shure H. — Cell, 1976, v. 7, p. 361. — 70. Ketner G., Kelly T. —

Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, p. 1102. — 71. Khoury G., Byrne J. C., Takemoto K. T. et al. — *J. Virol.*, 1973, v. 11, p. 54. — 72. Khoury G., Carter B. J., Ferdinand F. J. et al. — *Ibid.*, 1976, v. 17, p. 832. — 73. Khoury G., Fareed G. C., Berry K. et al. — *J. Molec. Biol.*, 1974, v. 87, p. 289. — 74. Khoury G., Howley P., Brown M. et al. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1975, v. 39, p. 147. — 75. Khoury G., Howley P. M., Garon C. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, p. 2563. — 76. Khoury G., Lewis A. M., Oxman M. et al. — *Nature, New Biol.*, 1973, v. 246, p. 202. — 77. Khoury G., Martin M. A., Lee T. N. H. et al. — *J. molec. Biol.*, 1973, v. 78, p. 377. — 78. Lai C., Nathans D. — *Virology*, 1974, v. 60, p. 466. — 79. Lai C., Nathans D. — *J. molec. Biol.*, v. 89, p. 179. — 80. Lai C., Nathans D. — *Cold Spr. Harb. quant. Biol.*, 1975, v. 39, p. 53. — 81. Lai C., Nathans D. — *Virology*, 1975, v. 66, p. 70. — 82. Lai C., Nathans D. — *Fed. Proc.*, 1975, v. 34, p. 515. — 83. Lebowitz P., Bloodgood R. — *J. molec. Biol.*, 1975, v. 94, p. 183. — 84. Lee T. N. H., Brockman W. W., Nathans D. — *Virology*, 1975, v. 66, p. 53. — 85. Lewis J. B., Atkins J. F., Anderson C. W. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, p. 1344. — 86. Lewis J. B., Atkins J. F., Baum P. R. et al. — *Cell*, 1976, v. 7, p. 141. — 87. Lingstrom D. M., Dulbecco R. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1972, v. 69, p. 1517. — 88. Lodish H. F., Weinberg R., Ozer H. L. — *J. Virol.*, 1974, v. 13, p. 590. — 89. Mantel N., Boyer H. W., Goodman H. M. — *Ibid.*, 1975, v. 16, p. 754. — 90. Martin M. A., Axelrod D. — *Science*, 1969, v. 164, p. 168. — 91. Martin M. A., Geld L. D., Garon C., et al. — *Virology*, 1974, v. 59, p. 173. — 92. Martin M. A., Khoury G., Fareed G. C. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1975, v. 39, p. 129. — 93. Martin R. G., Chou J. Y. — *J. Virol.*, 1975, v. 15, p. 599. — 94. Mautner V., Williams J., Sambrook J. et al. — *Cell*, 1975, v. 5, p. 93. — 95. May E. Kopecka H., May P. — *Nucl. Acids Res.*, 1975, v. 2, p. 1995. — 96. Mayne N., Burnett J. P., Butler L. K. — *Nature, New Biol.*, 1971, v. 232, p. 5. — 97. McGuire P. M., Piatak M., Hodge L. D. — *J. molec. Biol.*, 1976, v. 101, p. 379. — 98. Mertz J. E., Berg P. — *Virology*, 1974, v. 62, p. 112. — 99. Mertz J. E., Berg P. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, p. 4879. — 100. Mertz J. E., Carbon J., Herzberg M. et al. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1975, v. 39, p. 69. — 101. Miller L. K., Fried M. J. — *J. Virol.*, 1976, v. 18, p. 824. — 102. Mulder C., Arrand J. B., Delius H. et al. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1975, v. 39, p. 397. — 103. Nussbaum A. L., Davoli D., Ganem D. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, p. 1068. — 104. Oberg B., Saborio J., Persson T. et al. — *J. Virol.*, 1975, v. 15, p. 199. — 105. Ohe K., Weissman S. M. — *J. biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 6991. — 106. Ozanne B., Sharp P. A., Sambrook J. — *J. Virol.*, 1973, v. 12, p. 90. — 107. Peterson U., Philipson L. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, p. 4887. — 108. Petersson U., Philipson L. — *Cell*, 1975, v. 6, p. 1. — 109. Peterson U., Sambrook J., Delius H. et al. — *Virology*, 1974, v. 59, p. 153. — 110. Petersson U., Tibbets C., Philipson L. — *J. molec. Biol.*, 1976, v. 101, p. 479. — 111. Philipson L., Petersson U., Lindberg U. et al. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1975, v. 39, p. 447. — 112. Prives C. L., Aviv H., Gilboa E. et al. — *Ibid.*, v. 39, p. 309. — 113. Prives C. L., Aviv H., Peterson B. M. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, p. 302. — 114. Reed S. I., Ferguson J., Davis R. W. et al. — *Ibid.*, 1975, v. 72, p. 1605. — 115. Roberts B. E., Gorecky M., Mulligan R. C. et al. — *Ibid.*, p. 1922. — 116. Rozenblatt S., Lavi S., Singer M. F. et al. — *J. Virol.*, 1973, v. 12, p. 501. — 117. Rozenblatt S., Mulligan R. C., Gorecky M. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, p. 2747. — 118. Sambrook J., Sugden B., Keller W. et al. — *Ibid.*, 1973, v. 70, p. 3711. — 119. Sambrook J., Williams J., Sharp P. A. et al. — *J. molec. Biol.*, 1975, v. 97, p. 369. — 120. Sharp P. A., Gallimore P. H., Flint S. J. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, v. 39, p. 457. — 121. Sharp P. A., Petersson U., Sambrook J. — *J. molec. Biol.*, 1974, v. 86, p. 709. — 122. Shenk T. E., Rhodes C., Rigby P. W. et al. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1975, v. 39, p. 457. — 123. Shenk T. E., Rhodes C., Rigby P. W. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, p. 989. — 124. Shishido K., Berg P. — *J. Virol.*, 1976, v. 18, p. 793. — 125. Smith H. O., Nathans D. — *J. molec. Biol.*, 1973, v. 81, p. 419. — 126. Surzycki J. A., De Lorbe W., Gussin G. N. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1975, v. 39, p. 501. — 127. Tal J., Craig E. A., Raskas H. J. — *J. Virol.*, 1975, v. 15, p. 137. — 128. Tal J., Craig E. A., Zimmer S. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, p. 4057. — 129. Tal J., Jacobi P., Raskas H. J. et al. — *Virology*, 1975, v. 68, p. 547. — 130. Tibbets C., Petersson U. — *J. molec. Biol.*, 1974, v. 88, p. 767. — 131. Türles H., Salomon C., Allet B. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, p. 1418. — 132. Weil R., Salomon C., May E. et al. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1975, v. 39, p. 381. — 133. Wein-

berg R. A., Ben-Ishai Z., Newbold J. E. — Nature, New Biol., 1972, v. 38, p. 111. — 134. Weinberg R. A., Ben-Ishai Z., Newbold J. E. — J. Virol., 1974, v. 13, p. 1263. — 135. Weinberg R. A., Warnaar S. O., Winocour E. — Ibid., 1972, v. 10, p. 193. — 136. Weinberg R. A., Newbold J. E. — Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1975, v. 39, p. 161. — 137. Weinman R., Raskas H. J., Roeder R. G. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 3426. — 138. Westphal H. — J. molec. Biol., 1970, v. 50, p. 407. — 139. Wiegand R. C., Godson C. N., Radding C. M. — Fed. Proc., 1974, v. 33, p. 1355. — 140. Williams J., Grodzicker T., Sharp P. et al. — Cell, 1975, v. 4, p. 113. — 141. Zain B. C., Dhar R., Weissman S. M., et al. — J. Virol., 1973, v. 11, p. 682. — 142. Zain B. C., Weissman S. M., Dhar R. et al. — Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, p. 577.

Поступила 17/V 1944 г

УДК 616.13-004.6-092.9-07:616.13-008.939.631-074

Л. А. Коннова

ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ КИСЛЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ АОРТЫ КРОЛИКА ПРИ РАЗВИТИИ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института

Гиперхолестеринемия, вызванная у кроликов добавлением в пищу холестерина, приводит к изменению фракционного состава кислых гликозаминогликанов интимы и меди аорты. В ранние сроки наблюдается возрастание содержания гиалуроновой кислоты и снижение сульфатированных компонентов на фоне повышения уровня дерматансульфата. Продолжительное кормление холестерином приводит к снижению содержания гиалуроновой кислоты, гепарансульфата и хондроитин-6-сульфата при сохранении высокого уровня дерматансульфата.

Основное вещество сосудистой стенки человека и животных имеет в своем составе более 5 видов кислых гликозаминогликанов (кГАГ), которые, помимо выполнения структурно-пластической функции, участвуют в регуляции проницаемости, ионного равновесия, активности некоторых ферментов, свертываемости крови, а также обладают способностью связывать липопротеиды плазмы [1—6]. Эти факты объясняют интерес к кГАГ с точки зрения их участия в генезе атеросклероза. Во многих работах отмечается изменение концентрации кГАГ в аорте при атеросклерозе, однако в них отмечается разноречивость результатов исследования фракционного состава кГАГ, что не позволяет уточнить роль отдельных компонентов в образовании атером [7—12]. Такое положение объясняется, с одной стороны, применением разных методов выделения, фракционирования и идентификации кГАГ ткани, а с другой — неоднородностью исследуемого материала в связи с разной степенью выраженности атеросклероза и видовой специфичностью спектра кГАГ у животных.

В настоящей работе представлены результаты сравнительной характеристики фракционного состава аорты кролика (интимы и меди) в норме и в процессе развития пищевой гиперхолестеринемии.

Методика

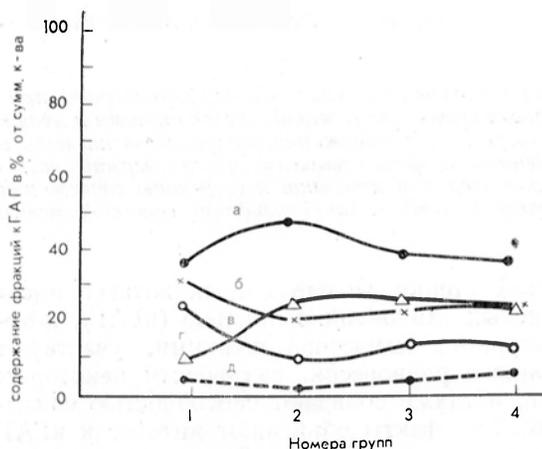
Исследование выполнено на 23 кроликах-самках массой 2,5—3,0 кг, которые были разделены на 4 группы: в 1-ю группу (контрольную) вошло 8 интактных кроликов, 2, 3 и 4-я включали по 5 кроликов, которые ежедневно получали с измельченными корнеплодами холестерин в дозе 0,5 на 1 кг массы в течение 7, 21 и 60 дней соответственно. В конце кормления в каждой группе определяли уровень холестерина крови по реакции Либмана — Бурхарда.

Суммарную смесь кГАГ выделяли из сухой, обезжиренной и высушенной до постоянного веса ткани аорты (интимы и меди) с помощью переваривания папаином (КФ 3.4.4.10), используя дважды перекристаллизованный фермент фирмы «Мерк». Непосредственно перед употреблением папаин активировали в присутствии 0,05 М солянокислого цистеина и 0,005 М ЭДТА при 60°C в течение 40 мин [13], затем добавляли его в инкубационную смесь из расчета 3 мг на 100 мг ткани, выдерживали 48 ч в термостате при 60°C, останав-

ливали протеолиз трихлоруксусной кислотой, супернатант собирали, смешивали с тремя объемами ацетата калия в абсолютном этаноле и оставляли на 24 ч при 4°C. Осадок кГАГ собирали центрифугированием и подвергали хроматографическому анализу на колонках с микрокристаллической целлюлозой марки ЛК фирмы «Лаксма», размером 0,8×8,0 см, уравновешенных 1% раствором цетилпиридинхлорида. Разделение на отдельные компоненты выполняли путем фракционной элюции цетилпиридиновых комплексов кГАГ, что позволяет выделить 5 фракций — гиалурионовую кислоту, гепарансульфат, хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат и дерматансульфат [14]. Для калибровки избранной нами колонки и учета выхода фракций хроматографировали известное количество стандартных препаратов кГАГ, предоставленных фирмой «Koch L. LTD», а также образец ткани с добавлением свидетелей. Выход составлял 95,5—102,0%. Количественную оценку фракций получали определением уроновых кислот карбазоловой реакцией [15]. Расчет производили в микрограммах уроновых кислот на 1 г сухой обезжиренной ткани.

Результаты и обсуждение

Аорта интактных кроликов, холестерин крови которых составлял $50,78 \pm 6,1$ мг%, содержала $3912,9 \pm 173,05$ мкг/г кГАГ, при этом на долю гиалурионовой кислоты приходится $1351,2 \pm 136,3$ мкг/г, что соответствует



Изменение процентного содержания отдельных фракций кГАГ в аорте в процессе развития экспериментальной гиперхолестеринемии.

а — гиалурионовая кислота, б — гепарансульфат, в — хондроитин-6-сульфат, г — дерматансульфат, д — хондроитин-4-сульфат; 1 группа — интактные кролики, 2 группа — на 7-й день атерогенной диеты, 3 группа — на 21-й день атерогенной диеты, 4-группа — на 60-й день атерогенной диеты.

34,53% от общего числа кГАГ (см. рисунок). Остальные 65,47% составляли сульфатированные кГАГ, включая $1193,35 \pm 192,7$ мкг гепарансульфата, $186,77 \pm 19,8$ мкг хондроитин-4-сульфата, $862,98 \pm 133,5$ мкг хондроитин-6-сульфата и $318,69 \pm 39,7$ мкг дерматансульфата (соответственно 30,49, 4,77, 22,05 и 8,14% от общей суммы кГАГ). Отношение сульфатированные/несульфатированные кГАГ равняется 1 : 0,52 и свидетельствует о преобладании первой группы компонентов. Результаты вполне согласуются с данными других авторов при пересчете содержания уроновых кислот на 1 г сухой ткани и вычислении процентного содержания каждой фракции [2, 11].

Кормление кроликов холестерином в течение 7 дней повышало содержание холестерина в крови до $119,71 \pm 19,5$ мг% и сопровождалось возрастанием общего количества кГАГ в аорте до $6404,7 \pm 1241,6$ мкг/г; при этом абсолютное содержание гиалурионовой кислоты вдвое превышало норму, составляя $2916,32 \pm 468,0$ мкг, что соответствует 45,5% от общего числа кГАГ, т. е. на 10% выше, чем в 1-й группе животных. Суммарное количество сульфатированных кГАГ составляет 54,5% по сравнению с 65,47% у интактных кроликов, в связи с чем отношение этих компонентов к гиалурионовой кислоте снижается до 1 : 0,83. При рассмотрении каждой отдельной фракции обнаруживается различная направленность их изменений. На долю гепарансульфата, абсолютное количество которого близко к норме и равняется $1260,64 \pm 126,37$ мкг/г, приходится 19,66%, что ниже нормы на 10%. Содержание хондроитин-6-сульфата снижается до $516,128 \pm 138,1$ мкг, составляя 8,1%, в то время как абсолютное и относительное содержание дерматансульфата возрастает в 3 раза — до $1491 \pm 518,8$ мкг (23,2%).

Через 21 день от начала проведения атерогенной диеты, когда уровень холестерина повышается до $171,75 \pm 29,5$ мг%, содержание общих кГАГ аорты продолжает оставаться повышенным, составляя $6138,0 \pm 1218,9$ мкг/г; при этом отношение сульфатированные/несульфатированные кГАГ достигает исходного уровня — 1 : 0,58, поскольку содержание хондроитин-6-сульфата и гепарансульфата повышается до $824,86 \pm 132,0$ и $1353,4 \pm 368,2$ мкг соответственно, что, однако, ниже, чем у интактных кроликов, и составляет 13,4 и 22,04%. Количество дерматансульфата остается высоким, составляя $1457,8 \pm 227,79$ мкг (23,7%), а хондроитин-4-сульфата сохраняется в прежних пределах — $223,6 \pm 21,67$ мкг (3,79%). Процентное содержание гиалуроновой кислоты возвращается почти к норме, составляя 36,9, несмотря на то что абсолютное количество ее остается значительным — $2266,49 \pm 698,4$ мкг.

Дальнейшее повышение уровня холестерина в крови до $477,84 \pm 94,1$ мг%, вызванное 60-дневным введением с пищей холестерина, вызывает снижение общего количества кГАГ в аорте до $4232,54 \pm 782,65$ мкг/г; при этом содержание гиалуроновой кислоты снижается по сравнению с таковым 2-й и 3-й групп у кроликов и равняется $1537,9 \pm 519,96$ мкг, но продолжает составлять, как и у животных 3-й группы, 36,21% вследствие изменений содержания других фракций: уровень гепарансульфата остается сниженным до $960,57 \pm 307,04$ мкг/г, соответствуя 22,6%, концентрация хондроитин-6-сульфата заметно снижена по сравнению с таковой у кроликов предыдущих групп — $465,98 \pm 121,1$ мкг, что соответствует половине относительного содержания этой фракции у интактных животных — 11,2 вместо 22,05%. По-прежнему остается высокой концентрация дерматансульфата, которая равна $973,66 \pm 221,64$ мкг (23%) и незначительно увеличивается уровень хондроитин-4-сульфата до $294,39 \pm 50,57$ мкг (6,94%).

Итак, в ранние сроки гиперхолестеринемии у кроликов, когда, как известно, еще нет отложения липидов в стенку аорты, происходит повышение общих кГАГ в интима и медиа и снижение отношения сульфатированные/несульфатированные кГАГ как за счет возрастания гиалуроновой кислоты, так и снижения сульфатированных кГАГ, несмотря на значительное повышение содержания дерматансульфата. Нахождение кроликов более продолжительный срок на атерогенной диете вызывает дальнейшее повышение содержания холестерина в крови и падение уровня гиалуроновой кислоты в ткани аорты на фоне постоянно высокой концентрации дерматансульфата, сниженного содержания гепарансульфата и хондроитин-6-сульфата и практически неизменного хондроитин-4-сульфата.

Какова возможная роль наблюдаемых изменений в процессе развития атеросклероза?

Согласно современным представлениям, кГАГ участвуют в образовании пространственной гидратированной сетки между коллагеновыми волокнами [5, 17]. Функциональная значимость отдельных компонентов определяется, по-видимому, их физико-химическими свойствами. Так, гиалуроновая кислота, являясь самым высокомолекулярным соединением этой группы веществ, обладает способностью связывать воду и поддерживать определенное состояние гелевого фильтра, препятствующего диффузии макромолекул [18]. Поэтому наблюдаемое нами возрастание концентрации гиалуроновой кислоты в ранние сроки экспериментального атеросклероза и дальнейшее снижение ее уровня могут влиять на вязкость основного вещества и способствовать проникновению липидов плазмы. Наши результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о повышении вязкости основного вещества аорты на первых стадиях атеросклероза и дальнейшем снижении ее при прогрессировании заболевания [19]. Кроме того, есть сведения о нарушении водосвязывающей способности ткани аорты при атеросклерозе [20].

Хондритин-6-сульфат имеет меньший по сравнению с гиалуроновой кислотой молекулярный вес и гидродинамический объем, но может регулировать проницаемость ткани вследствие способности связывать и обменивать катионы [21]. Поэтому снижение концентрации этого полисахарида может лежать в основе нарушения ионного баланса, наблюдаемого при атеросклерозе в сосудистой стенке [22]. Более того, представляют интерес факты комплексообразования сульфатированных кГАГ с липопротеидами плазмы *in vitro* [23] и присутствия таких комплексов *in vivo* в пораженных участках аорты человека [24, 25]. При этом дерматансульфат, концентрация которого, по нашим наблюдениям, значительно возрастает, способен связывать липопротеиды низкой плотности. С другой стороны, эта фракция, как и гепарансульфат, отличается антикоагулирующим свойством [26, 27], поэтому изменение ее концентрации может быть компенсацией за снижение уровня гепарансульфата. Кроме того, можно также предположить, что уменьшение количества гиалуроновой кислоты на фоне повышенного содержания дерматансульфата связано с изменением активности гиалуронидазы в более поздние сроки атеросклероза, так как в отличие от гиалуроновой кислоты дерматансульфат резистентен к действию этого фермента [8].

Таким образом, полученные нами данные о динамике изменений фракционного состава кГАГ стенки аорты в процессе развития экспериментальной гиперхолестеринемии при учете имеющихся в литературе сведений о физико-химических свойствах и возможной биологической роли этих соединений свидетельствуют о том, что нарушение структуры основного вещества является важным звеном в сложной цепи биохимических механизмов развития атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА

1. С л у ц к и й Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л., 1969, с. 291. — 2. Mullinger R. N., Manley E. — *J. Atheroscler. Res.*, 1969, v. 9, p. 108. — 3. Engler U. R. — *Atherosclerosis*, 1971, v. 13, p. 45. — 4. Eisenstein R., Larsson S., Ruettger K. E. et al. — *Ibid.*, 1975, v. 22, p. 1. — 5. David H. — *New Sci.*, 1975, v. 67, p. 636. — 6. Nakashima Yasuhide, DiFerrante N., Jackson R. L. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, p. 5386. — 7. Buddecke E. — *J. Atheroscler. Res.*, 1962, v. 2, p. 32. — 8. Klynstra F. B., Böttcher C., Melsen J. et al. — *Ibid.*, 1967, v. 7, p. 301. — 9. Никифорова Л. Ф. — В кн.: Современные биохимические и морфологические проблемы соединительной ткани. Новосибирск, 1971, с. 296. — 10. Anastassiades T., Anastassiades P. A., Denstedt O. F. — *Biochim. biophys. Acta.*, 1972, v. 261, p. 418. — 11. Fu Sio Ta., Ho Kang Jey, Taylor C. B. et al. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1973, v. 142, p. 607. — 12. Vijaykumar S. T., Leelamma S. and Kurup P. A. — *Atherosclerosis*, 1975, v. 2, p. 1. — 13. Antonopoulos C. A., Gardell S., Szirmai J. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1964, N. 83, p. 1. — 14. Sveicar J., Robertson W. — *Analyt. Biochem.*, 1967, v. 18, p. 333. — 15. Bitter T., Muir H. — *Ibid.*, 1962, v. 4, p. 330. — 16. Stefanovich V., Gore J. — *J. Chromatogr.*, 1967, v. 3, p. 479. — 17. Д ж а к с о н Д. С., С т е в е н Ф. С. — В кн.: Современные биохимические и морфологические проблемы соединительной ткани. Новосибирск, 1971, с. 13. — 18. Laurent T. C. — *Fed. Proc.*, 1966, v. 25, p. 1128. — 19. Gombas Van Margit, Lusztig G. — *Dtsch. Z. Verdau-u. Stoffwechselfkr.*, 1972, Bd 32, S. 355. — 20. Hesz A., Lusztig G. — *Kiserl. orvostud.*, 1973, v. 24, p. 260. — 21. Simard S. J., Friedman S. M. — *Experientia (Basel)*, 1970, v. 26, p. 834. — 22. Р а ш е в М., Т и н т е р о в а З., О г и я н о в М. и др. — *Съвр. мед.*, 1973, т. 24, с. 10. — 23. Iverius P. H. — *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, p. 2607. — 24. Bichari-Vargs M., Vegh M. — *Biochim. biophys. Acta*, 1967, v. 144, p. 202. — 25. Srinivasan S. K., Dolan P., Radha — *Krishnamurthy B. et al.* — *Atherosclerosis*, 1972, v. 16, p. 95. — 26. Andersen A. J. — *Biochem J.*, 1963, v. 88, p. 460. — 27. Izuka K., Murata R. — *Atherosclerosis*, 1972, v. 16, p. 217.

Поступила 13/II 1978 г.

THE FRACTIONAL COMPOSITION OF ACID GLYCOSAMINOGLYCANS

L. A. Konnova

Central Research Laboratory, Sanitary-Hygiene Medical Institute, Leningrad

Dynamics of alterations in fractional composition of acid glycosaminoglycans from rabbit aorta (intima + media) was shown in development of experimental hypercholesterolemia. Importance of separate components, including hyaluronic acid, heparan sulfate, dermatan sulfate, chondroitin-4/and 6-/sulfates, for pathogenesis of atherosclerosis is discussed.

УДК 617-001.17-092.9-085.355:577.152.344.042.2]-07:616-008.5

И. М. Носова, Т. И. Коткина, Т. Л. Заец

ВЛИЯНИЕ КОНТРИКАЛА НА АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ИХ ИЗОФЕРМЕНТЫ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ОБОЖЖЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Лаборатория биохимии Института хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР,
Москва

В эксперименте на животных показано, что ингибитор протеаз контрикал обладает выраженным воздействием на активность лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и их изоферментный спектр, главным образом корригируя функцию окислительно-восстановительных ферментов.

В последние годы в терапии ожоговой болезни широко применяются ингибиторы трипсин-калликреиновой системы — контрикал, трасилол и др., которые, согласно данным литературы, оказывают влияние на интенсивность протеолитических процессов при термических поражениях [1, 2]. Действие контрикала на окислительно-восстановительные процессы при ожоговой болезни практически не изучено, между тем как их нарушение играет важную роль в патогенезе заболевания. Известно, кроме того, что контрикал изменяет функцию окислительно-восстановительных ферментов у животных с развивающейся грануляционной тканью [3, 4].

В настоящем исследовании изучалось влияние контрикала на активность окислительно-восстановительных ферментов — лактатдегидрогеназы [ЛДГ] и малатдегидрогеназы [МДГ] — у обожженных животных. При этом наряду с определением общей активности ферментов мы изучали также относительную активность их изоферментов.

М е т о д и к а

В опыте использовали крыс-самцов массой 150—200 г. Ожог 20% поверхности тела IIIБ степени вызвали пламенем. Все животные были разделены на 3 группы: 1-я группа — интактные, 2-я группа — обожженные, 3-я группа — обожженные, которым вводили ингибитор трипсина и калликрейна контрикал внутривентриально ежедневно в течение 8 дней, начиная со дня нанесения ожога, из расчета 10 000 ЕД на крысу. Кроме того, специальной группе интактных животных внутривентриально вводили контрикал в дозе 10 000 ЕД на крысу ежедневно в течение 8 дней. На 8-е сутки после ожога и соответственно после начала введения контрикала животных декантировали. Для исследования брали обожженную кожу (струпу), полоску кожи, окаймляющую зону ожога, ткань непосредственно под струпом (так называемая подлежащая ткань), мышцы, печень, почки и миокард. Суммарную активность ЛДГ и МДГ определяли спектрофотометрически [5, 6]. Разделение на изоферменты проводили по методу Ю. А. Юркова [7].

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

Проведенные исследования показали, что под влиянием ожоговой травмы снижается активность МДГ в печени и сердце; изоферментный спектр МДГ в исследованных органах при этом не изменяется. (табл. 1).

Суммарная активность ЛДГ во внутренних органах и мышце в данный срок термического воздействия существенным образом не меняется (табл. 2). Наиболее значительные изменения общей активности ЛДГ наблюдаются в коже, процент снижения активности в струне составляет 62,2, в окаймляющей зоне — 34,4, в подлежащей ткани — 81,8.

Изоферментный спектр ЛДГ изменялся только в почках и коже. В почках активность ЛДГ₂ увеличивалась, а активность ЛДГ₅ снижалась. В струне, окаймляющей зоне и подлежащей ткани отмечалось выраженное увеличение активности ЛДГ₁ (на 83,6%, 92,3% и 46,5% соответственно), а в подлежащей ткани, кроме того, на фоне незначительного снижения ЛДГ₂ и ЛДГ₃ наблюдалось увеличение ЛДГ₅.

Таблица 1

Влияние контрикала на активность МДГ и ее изоферментов в органах и тканях обожженных животных

Орган	Условия опыта	Общая активность МДГ	Активность изоферментов			
			МДГ ₁	МДГ ₂	МДГ ₃	МДГ ₄
Печень	Контроль	213 ± 29,82	4,3 ± 0,77	7,7 ± 1,795	44,0 ± 3,95	43,95 ± 2,36
	Ожог	119,5 ± 12,74*	2,96 ± 0,294	6,66 ± 1,16	44,86 ± 2,43	45,5 ± 1,82
Почки	Ожог + контрикал	175,7 ± 15,3**	3,8 ± 0,42	7,1 ± 0,68	42,56 ± 3,10	44,31 ± 2,53
	Контроль	16,3 ± 15,02	—	5,3 ± 1,12	48,2 ± 1,67	46,45 ± 2,777
Сердце	Ожог	15,3 ± 9,28	—	5,9 ± 0,38	48,2 ± 0,91	45,9 ± 1,11
	Ожог + контрикал	218 ± 17,9*	—	15,0 ± 2,5	45,2 ± 2,18	38,1 ± 1,18
Сердце	Контроль	350 ± 11,59	5,02 ± 0,3	12,9 ± 1,113	47,4 ± 2,94	35,2 ± 2,51
	Ожог	287 ± 14,0*	4,3 ± 0,78	13,8 ± 0,85	46,75 ± 2,23	35,0 ± 1,71
	Ожог + контрикал	349 ± 24,59**	5,5 ± 1,6	15,8 ± 4,3	36,3 ± 5,8	42,4 ± 3,37

Примечание. Здесь и в табл. 2.

* $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

** $P < 0,05$ по сравнению с ожогом.

P — рассчитано по отношению к данным у интактных и у обожженных животных.

Введение контрикала вызывало повышение активности МДГ во всех исследованных органах, при этом активность указанного фермента в печени и сердце достигала цифр в норме, а в почках превышала ее. Влияние контрикала на изоферментный спектр МДГ было наиболее выражено в почках и сердце: в почках отчетливо снижалась активность МДГ₄, а в сердце снижалась активность МДГ₃ и увеличивалась активность МДГ₄.

Введение контрикала значительно изменяло также суммарную активность ЛДГ в почках и ее изоферментный спектр в почках и печени. При этом наблюдалось относительное снижение общей активности фермента на 38%, угнетение активности ЛДГ₁ и повышение активности ЛДГ₃ и ЛДГ₄. В почках, кроме того, снижалась активность ЛДГ₅. Своеобразную реакцию изоферментного спектра ЛДГ в ответ на введение контрикала мы отметили в исследуемых участках обожженной кожи, окаймляющей зоне и подлежащей ткани. На фоне неизменяющейся суммарной активности ЛДГ отмечалось четко выраженное снижение активности ЛДГ₁, ЛДГ₂ и ЛДГ₃ и увеличение активности ЛДГ₅. В подлежащей ткани ответная реакция выразилась в повышении активности только ЛДГ₅. Активность ЛДГ и ее изоферментный спектр в мышцах, удаленных от зоны поражения, под влиянием контрикала не изменялись.

Проведенные исследования показали, что ожоговая травма сопровождается выраженными расстройствами со стороны ферментативных реакций внутренних органов, кожи и подлежащей ткани. На 8-е сутки после ожога наблюдались угнетение суммарной активности МДГ в печени и сердце, а также перестройка изоферментного спектра ЛДГ в печени и почках. В струне, окаймляющей зоне и подлежащей ткани изменение соотношения изоферментов ЛДГ сочеталось с резким угнетением общей активности фермента.

Таблица 2

Влияние контрикала на активность лактатдегидрогеназы и ее изоферментов в органах и тканях обожженных животных

Исследованный показатель	Печень			Почки			Сердце			Кожа
	контроль	ожог	ожог + контрикал	контроль	ожог	ожог + контрикал	контроль	ожог	ожог + контрикал	контроль
Общая активность ЛДГ	5194,3 ± 647	4395 ± 117,2	3642 ± 167,3	2582 ± 351,3	3051 ± 209,9	1892 ± 234	5068,25 ± 252,7	4866 ± 225,6	4456,6 ± 178,45	2929,97 ± 415,11
ЛДГ ₁	24,3 ± 2,95	22,6 ± 1,033	11,5 ± 2,04**	46,4 ± 0,9	51,9 ± 3,66	26,6 ± 1,03	23,8 ± 0,4	30,2 ± 4,3	25,9 ± 1,93	5,60 ± 1,10
ЛДГ ₂	20,2 ± 2,585	23 ± 1,427	18,8 ± 0,9	10,5 ± 1,03	19,05 ± 2,757	28,5 ± 2,09	26,4 ± 0,5	24,6 ± 2	31,35 ± 0,7125	13,83 ± 1,05
ЛДГ ₃	3,2 ± 1,03	5,3 ± 1,377	18,83 ± 1,8**	1,53 ± 0,29	2,6 ± 0,893	15,0 ± 0,9**	24,06 ± 0,9	23,4 ± 1,4	20,3 ± 1,1565	18,36 ± 0,96
ЛДГ ₄	3,45 ± 0,485	5,5 ± 0,903	15,9 ± 1,62**	4,93 ± 1,7	2,75 ± 0,97	14,5 ± 0,6**	17,08 ± 0,6	14,9 ± 2,03	10,7 ± 1,3965	24,19 ± 0,85
ЛДГ ₅	48,75 ± 2,17	43,6 ± 4,2	34,63 ± 3,77	36,63 ± 2,4	23,7 ± 2,478*	15,45 ± 0,4	8,85 ± 0,8	6,97 ± 0,8	11,6 ± 3,0125	34,30 ± 2,66

Исследованный показатель	Кожа				Ткань непосредственно под струпом или кожей			Мышцы		
	струп		окаймляющая зона		контроль	ожог	ожог + контрикал	контроль	ожог	ожог + контрикал
	ожог	ожог + контрикал	ожог	ожог + контрикал						
Общая активность ЛДГ	1108,0 ± 76,16*	1191,66 ± 263,00	1922,3 ± 251,03*	1775,0 ± 375,0	5082 ± 342	2260,0 ± 181,68*	903,33 ± 92,41	8760 ± 106	8441 ± 356	7516 ± 406
ЛДГ ₁	10,28 ± 1,44	3,16 ± 0,98**	10,77 ± 2,14	2,40 ± 0,30**	10,2 ± 1,08	15,83 ± 2,22	13,40 ± 5,55	15,8 ± 2,20	17,8 ± 2,0	16,4 ± 1,7
ЛДГ ₂	10,55 ± 1,40	5,93 ± 1,22*	14,40 ± 0,98	3,30 ± 0,52**	17,4 ± 1,62	12,40 ± 1,70	11,83 ± 2,71	17,1 ± 0,83	17,2 ± 0,62	18,8 ± 0,93
ЛДГ ₃	20,15 ± 1,39	12,43 ± 1,69	21,13 ± 2,43	4,80 ± 0,58**	20,0 ± 2,3	16,16 ± 1,63	14,36 ± 2,65	17,7 ± 0,3	16,6 ± 0,5	17,9 ± 0,2
ЛДГ ₄	24,85 ± 0,48	20,76 ± 2,22	22,40 ± 2,34	18,20 ± 0,92	21,6 ± 0,93	29,96 ± 3,86	25,80 ± 0,60	21,8 ± 0,5	21,7 ± 0,4	22,7 ± 0,2
ЛДГ ₅	36,65 ± 2,97	58,03 ± 5,31	31,30 ± 2,49	71,0 ± 6,20**	24,1 ± 0,86	34,63 ± 0,78*	47,53 ± 2,64*	28,5 ± 2,4	2,62 ± 1,7	25,0 ± 1,9

* P < 0,05 по сравнению с контролем, ** P < 0,05 по сравнению с ожогом.

Снижение активности МДГ в органах обожженных животных отмечалось и в более ранние сроки после травмы, а изменения изоферментного спектра ЛДГ надпочечников через 2—3 и 6—8 ч после ожога отмечали А. А. Покровский и К. А. Коровников [9] и через 48 ч в сердце, печени, мозге и др.— В. И. Добрынина и соавт. [10].

Введение контрикала обожженным животным вызывало активацию МДГ во всех исследуемых органах. Подобный эффект ингибитора трипсинопопротеаз на активность МДГ, главным образом мышца, мы наблюдали ранее у животных с развивающейся грануляционной тканью [4]. В настоящих экспериментах изоферментный спектр МДГ под влиянием контрикала изменялся не только в почках, что наблюдалось у животных с развивающейся грануляционной тканью, но и в сердце, что, вероятно, обусловлено различным исходным фоном, на котором проводилось лечение контрикалом. Действие ингибитора на изоферментный спектр ЛДГ выража-

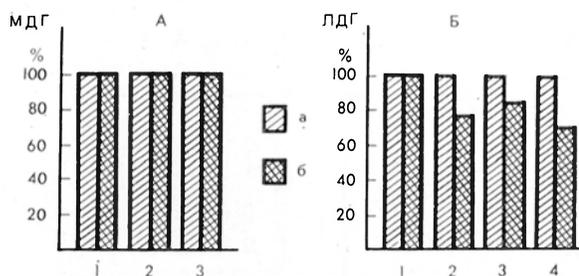


Рис. 1. Влияние контрикала на активность МДГ (А) и ЛДГ (Б) в органах и тканях интактных животных (за 100% принят уровень соответствующих показателей у интактных животных).

Здесь и на рис. 2: 1 — сердце; 2 — печень; 3 — почки; 4 — мышцы; а — контроль; б — добавление контрикала.

лось в понижении активности анодной фракции ЛДГ₁ в большинстве исследуемых тканей, исключение составляли миокард и скелетная мышца; в тканях ожоговой раны снижалась активность ЛДГ₂ и ЛДГ₃. В печени и почках активность контрикала повышалась. Одновременно в этих органах увеличивалась активность ЛДГ₄. Следует также отметить противоположный характер изменений активности ЛДГ₅ в тканях ожоговой раны и во внутренних органах на фоне введения контрикала: значительное увеличение активности в струпе, окаймляющей зоне и подлежащей ткани, снижение в почках и тенденции к снижению ее в печени, что, вероятно, связано со спецификой метаболических расстройств в зоне повреждения и внутренних органах при термических поражениях. Аналогичные сдвиги в изоферментном спектре ЛДГ под влиянием контрикала наблюдались в мышце, прилежащей к грануляционной ткани [4]. С целью выяснения возможного механизма действия контрикала на окислительно-восстановительные ферменты была проведена специальная серия экспериментов, в которой контриказ вводили интактным животным по схеме, аналогичной схеме введения обожженным. Было показано, что введение контрикала в этих опытах практически не оказывало влияния на суммарную активность МДГ в исследованных органах, изоферментный спектр менялся только в сердце — увеличивалась активность МДГ₃ (рис. 1 и 2).

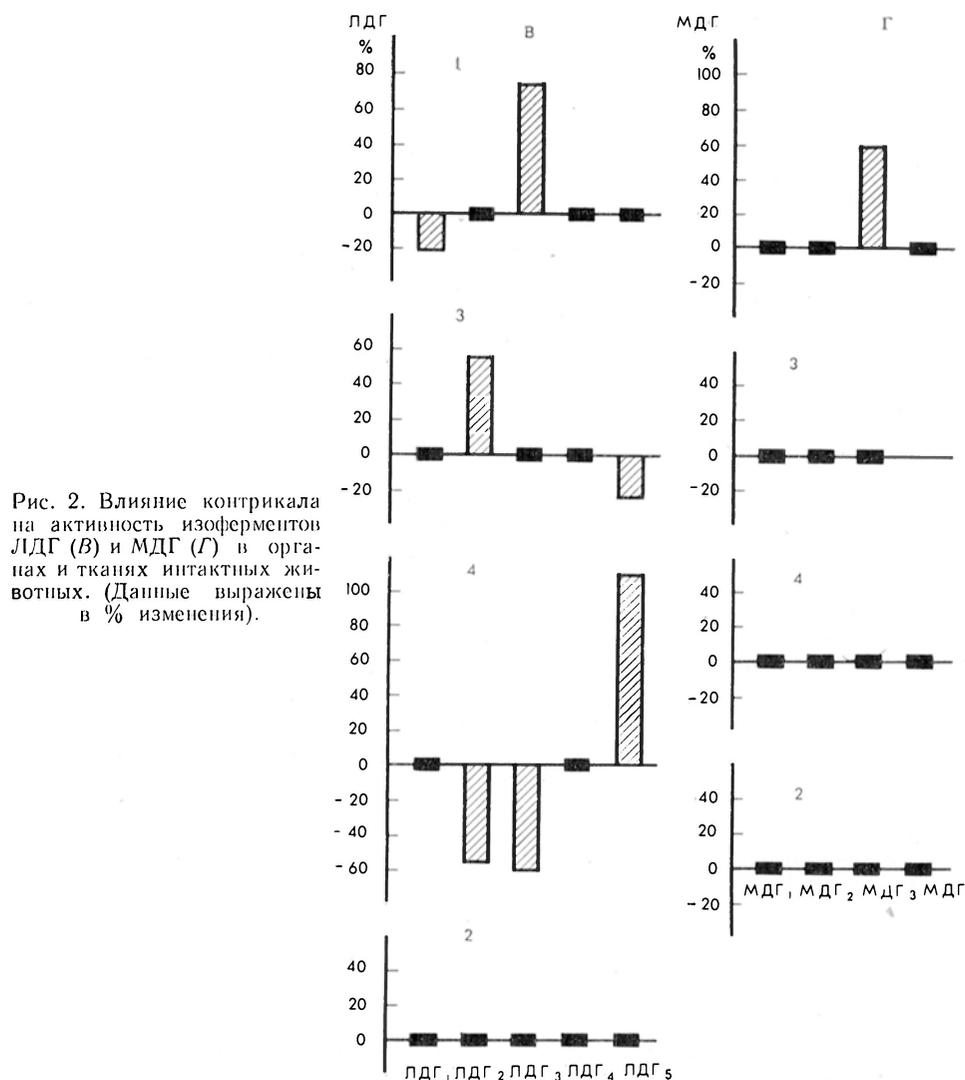
Активность ЛДГ достоверно снижалась в печени, почках и мышцах. Изменения изоферментного спектра в сердце выражались в незначительном угнетении ЛДГ₁ и увеличении активности ЛДГ₃, в почках увеличивалась активность ЛДГ₂ и снижалась активность ЛДГ₅, в мышцах изменения были наиболее выражены и проявлялись в угнетении аэробных фракций и активации анаэробной фракции.

Таким образом, введение контрикала интактным животным вызывало некоторую дискоординацию ферментных систем, что особенно четко видно на соотношении изоферментов ЛДГ. Действие контрикала на ЛДГ и ее спектр было однонаправленным с действием ингибитора на соответствующие показатели у обожженных животных, следовательно, ингибитор трип-

син-калликреиновой системы и в норме, и при патологии обладает определенным воздействием на ЛДГ.

Поскольку стимулирующее влияние, которое оказывал контрикал на активность МДГ в ряде внутренних органов и тканей обожженных животных, мы не отмечали в норме, можно заключить, что влияние ингибитора трипсин-калликреиновой системы на окислительно-восстановительные ферменты не является прямым и большое значение при этом имеет исходный фон ферментативных процессов.

По-видимому, торможение или нормализация активности протеаз кининовой системы и других протеолитических ферментов способствует улуч-



шению метаболических процессов в органах и тканях, в том числе и окислительных. Таким образом, между окислительно-восстановительными и протеолитическими ферментами, возможно, существует опосредованная взаимосвязь.

Таким образом, исследуя влияние контрикала на активность ЛДГ и МДГ в организме обожженных животных, нам удалось установить, что контрикал обладает определенным действием на изучаемые ферменты, при этом влияние данного препарата не ограничивается действием на суммарную

активность, а распространяется и на изоферментный спектр. Кроме того, действие ингибитора неоднозначно и носит органоспецифический характер. Возможно, что повышение активности МДГ практически во всех органах и снижение ЛДГ₅ во внутренних органах отражает улучшение окислительных процессов в организме. В этом плане представляет интерес исследование В. С. Якушева и соавт. [8], которые изучали влияние трасилола на метаболизм миокарда в остром периоде экспериментальной ишемии мышцы сердца. Авторы показали, что введение трасилола оказывает положительное влияние на окислительные процессы в миокарде и способствует нормализации изоферментных спектров, особенно МДГ. При сопоставлении наших данных с указанными выше результатами обращает на себя внимание тот факт, что мы также обнаружили выраженное влияние ингибитора на активность окислительно-восстановительных ферментов.

Полученные результаты позволили прийти к выводу, что ингибитор трипсин-калликреиновой системы, помимо своего прямого специфического действия, неоднократно описанного в литературе, обладает четко выраженным влиянием на окислительные ферменты, что расширяет возможность его применения при ряде патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заец Т. Л., Долгина М. И., Музыкант Л. И. и др. — Экспер. хир., 1974, № 5, с. 49. — 2. Долгина М. И., Заец Т. Л., Панова Ю. М. и др. — В кн.: Научная конференция по проблеме «Ожоги». 6-я. Тезисы докладов. Л., 1974, с. 41. — 3. Зайденберг М. А., Носова И. М., Музыкант Л. И. — Бюлл. экспер. биол., 1976, № 6, с. 77. — 4. Носова И. М., Зайденберг М. А. — Там же, 1976, № 7, с. 807. — 5. W g o b l e w s k i F., L a D u e J. S. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1955, v. 90, p. 210. — 6. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София, 1968. — 7. Юрков Ю. А. — Вопр. мед. химии, 1968, № 5, с. 575. — 8. Якушев В. С., Лифшиц Р. И., Слободин В. Б. и др. — Кардиология, 1975, № 4, с. 114. — 9. Покровский А. А., Коровников К. А. — Вестн. АМН СССР, 1971, № 11, с. 51. — 10. Добрынина В. И., Разин А. С., Фридман К. Е. — Пат. физиол., 1974, № 2, с. 24.

Поступила 10/1 1978 г.

EFFECT OF CONTRICAL ON ACTIVITY OF LACTATE AND MALATE DEHYDROGENASES IN TISSUES OF ANIMALS AFTER BURNS

I. M. Nosova, T. I. Kotkina, T. L. Zaets

Laboratory of Biochemistry, A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Contrical (an inhibitor of proteinases) exhibited distinct effect on activity and isozyme spectra of lactate and malate dehydrogenases from tissues of animals, subjected to burns. The effect of contrical was considered as leading to correction of the impaired functions of the oxidoreductases in burns.

УДК 616.127-008.939.633.2-02:616.839.6-089.871-073.916

Б. И. Ваняев

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РАДИОАКТИВНОГО ФОСФОРА (³²P) И ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБМЕНА АТФ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЧАСТИЧНОЙ ПАРАСИМПАТЭКТОМИИ И ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

Кафедра патофизиологии Ивано-Франковского медицинского института

В опытах на крысах изучали интенсивность включения радиоактивного фосфора (³²P) в различные отделы миокарда в условиях левосторонней ваготомии и физической нагрузки, а также интенсивность обмена АТФ. На 5, 10, 30 и 105-й дни после операции в сердечной мышце отмечено повышение интенсивности включения ³²P. В заданных па-

раметрах физическая нагрузка у контрольных и ваготомированных животных приводит к снижению включения изотопа в ткани сердца. Перерезка блуждающего нерва не изменяет содержания АТФ в миокарде крыс, но увеличивает интенсивность ее обмена.

Экстракардиальные нервы играют важную роль в трофическом обеспечении функции сердца [1, 2]. Нарушение трофического влияния блуждающего нерва на сердце приводит к снижению содержания гликогена и увеличению активности сукцинатдегидрогеназы в сердечной мышце [3—5]. Концентрация макроэргических фосфорных соединений в условиях правосторонней или левосторонней ваготомии в миокарде существенно не изменяется, а потенциал фосфорилирования даже уменьшается [6]. Приведенные данные противоречивы, так как известно, что с увеличением потенциала фосфорилирования окислительные процессы в сердечной мышце снижаются [7].

Настоящее исследование направлено на изучение интенсивности включения радиоактивного фосфора (^{32}P) в ткань предсердий и желудочков в разные сроки после нарушения центральных парасимпатических влияний на сердце. Параллельно изучали содержание и интенсивность обмена АТФ в миокарде крыс в норме и динамику их изменения под влиянием частичной парасимпатической денервации. Выясняли также воздействие физической нагрузки на интенсивность включения радиоактивного фосфора в ткань левого желудочка после левосторонней ваготомии.

М е т о д и к а

Опыты проведены на 202 белых крысах-самцах массой 170—225 г. Нарушение парасимпатических влияний на сердце достигалось перерезкой левого блуждающего нерва на шее. Включение радиоактивного фосфора в ткани изучали на 5, 10, 16, 30 и 105-й дни после ваготомии в обычных условиях, а также после воздействия физической нагрузки. Физическая нагрузка — бег в электротредбане, двукратно, с промежутком 24 ч, со скоростью 29,8 м/мин, продолжительностью 20 мин. Для определения наиболее оптимального срока экспозиции изотопа при изучении интенсивности включения его в ткани сердца интактным животным внутривенно вводили радиоактивный фосфор в виде $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$. Животных забивали через 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 и 60 мин, а затем через каждый час в течение 6 ч. Ткань сердца отмывали от крови и просушивали фильтровальной бумагой. Радиоактивность крови и ткани сердца определяли на установке Б-4 с торцовым счетчиком СБТ-13. Расчет производили в импульсах в минуту на 1 мг, а также определяли относительную радиоактивность (отношение радиоактивности ткани к радиоактивности крови). Интактных и ваготомированных животных подвергали физической нагрузке непосредственно после введения изотопа. Животных брали в опыт через 20 мин. Для определения интенсивности обмена АТФ спустя 20 мин после внутрибрюшинного введения раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия из расчета 2,72 мкКи на 100 г массы у наркотизированных животных извлекали сердце и замораживали его в жидком азоте. Определяли концентрацию и удельную активность АТФ по методике М. Е. Райскиной и соавт. [8]. Результаты исследования обрабатывали статистически разностным методом [9].

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

Результаты исследования содержания радиоактивного фосфора в крови и ткани левого и правого желудочков представлены на рис. 1. Выявлено, что интенсивность включения радиоактивного фосфора в ткань как левого, так и правого желудочка зависит от экспозиции изотопа. Так, в ранние сроки (5, 10, 15, 20, 25, 30 и 45 мин) после введения изотопа интенсивность включения радиоактивной метки в ткань желудочков соответственно нарастает, одновременно снижается содержание радиоактивного фосфора в крови. Наиболее значительное увеличение включения радиоактивной метки в ткань левого и правого желудочков обнаружено через 60 мин после введения изотопа. Радиоактивность крови и ткани желудочков сохраняется затем на постоянном уровне. Интенсивность включения радиоактивного фосфора в ткань желудочков по отношению к радиоактивности крови (относительная активность) также существенно увеличилась (с 5 до

60 мин) после его введения. В более поздние сроки (2, 3, 4, 5 и 6 ч) относительная активность оставалась стабильной.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в ранние сроки после введения изотопа происходит значительное включение радиоактивного фосфора в ткань желудочков сердца и снижение содержания радиоактивной метки в крови. Это является доказательством преобладания включения радиоактивного фосфора в ткань миокарда над его освобождением из ткани в кровь.

В более поздние сроки (2, 3, 4, 5 и 6 ч) после введения радиоактивной метки устанавливается изотопное равновесие, т. е. включение радиоактивного фосфора в ткань и его поступление из ткани в кровь поддерживаются на одном уровне. Естественно, надо полагать, что ранние сроки экспозиции изотопа являются наиболее оптимальными для исследования интенсивности включения радиоактивного фосфора в ткани сердца.

Результаты исследования включения радиоактивного фосфора в ткань желудочков и предсердий ваготомированных животных представлены в таблице.

Влияние ваготомии на включение радиоактивного фосфора в различные отделы сердца крыс (экспозиция изотопа 20 мин)

Условия опыта	Относительная радиоактивность, %			
	левый желудочек	правый желудочек	левое предсердие	правое предсердие
Интактные животные	285±12	278±8	273±20	217±16
Ваготомированные животные:				
5-й день после операции	381±19	367±23	241±12	245±11
<i>P</i>	<0,001	<0,01	>0,5	<0,2
10-й день после операции	347±21	282±22	235±30	208±11
<i>P</i>	<0,05	<0,001	<0,5	>0,5
16-й день после операции	271±19	239±16	270±30	232±16
<i>P</i>	>0,5	<0,05	>0,5	>0,5
30-й день после операции	439±30	456±23	242±23	402±25
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,5	<0,001
105-й день после операции	388±11	328±30	201±25	320±32
<i>P</i>	<0,001	<0,2	<0,1	<0,02

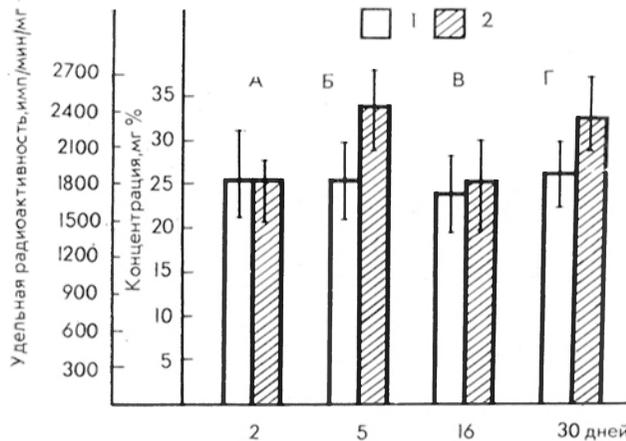
Изучение радиоактивности различных отделов миокарда интактных животных позволило проследить определенную топографию распределения изотопа. Меченый фосфор наиболее интенсивно проникает в левый желудочек и меньше всего — в правое предсердие. Эти данные о распределении радиоактивного фосфора в различных структурах сердца согласуются с результатами других авторов [10--12].

Установлено, что интенсивность включения радиоактивного фосфора в предсердия и желудочки ваготомированных крыс зависит от срока выключе-

чения парасимпатических влияний на сердце. Так, на 5-й день после операции относительная активность ткани левого желудочка возрастает до $381 \pm 19\%$ против $285 \pm 12\%$ у интактных животных ($P < 0,001$), а правого — с 278 ± 8 до $367 \pm 23\%$ ($P < 0,01$).

Увеличение включения радиоактивного фосфора в ткань левого желудочка носило стойкий характер и наблюдалось через 5, 10, 30 и 105 дней после ваготомии. Одновременно повышалось включение изотопа в ткань правого желудочка. Характерно, что относительная активность ткани левого предсердия существенно не изменялась во все сроки исследования. В более поздние сроки после ваготомии (30, 105 дней) статистически достоверно повышается включение радиоактивного фосфора в ткань правого предсер-

Рис. 2. Концентрация и удельная радиоактивность АТФ миокарда крыс.
1 — концентрация; 2 — удельная радиоактивность.
А — контроль; Б — 5; В — 16, Г — 30 дней после ваготомии.



дия. Следовательно, частичное выключение парасимпатических влияний на сердце приводит к увеличению включения радиоактивного фосфора в ткань правого предсердия и левого и правого желудочков.

Можно полагать, что увеличение включения радиоактивного фосфора связано как с изменением проницаемости гистогематического барьера, так и с повышением интенсивности обмена макроэргических фосфорных соединений в сердечной мышце.

Результаты исследования интенсивности синтеза АТФ с помощью радиоактивного фосфора представлены на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что в условиях частичной парасимпатэктомии содержание АТФ существенно не изменяется. Изменение синтеза АТФ зависит от длительности выключения парасимпатических влияний на сердце. Наиболее отчетливое и статистически достоверное повышение удельной активности АТФ отмечено через 5 и 30 дней после ваготомии. На 5-й день после операции удельная активность возрастает на 34,6%, а к 30-му дню — на 30%.

Повышение интенсивности включения радиоактивного фосфора в АТФ сердечной мышцы при перерезке левого блуждающего нерва указывает на увеличение интенсивности обмена. Обнаруженное нами более выраженное включение радиоактивного фосфора и синтез АТФ в ткани левого желудочка ваготомированных животных связаны, очевидно, с преобладанием симпатических нервных влияний на сердце.

Известно, что усиление симпатических влияний на сердце приводит к усилению обмена макроэргических фосфорных соединений в сердечной мышце [13].

С целью изучения адаптационных возможностей сердца в условиях нарушения его иннервации ваготомированных крыс подвергали физической нагрузке. Результаты исследования интенсивности включения радиоактивного фосфора в миокард крыс представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, физическая нагрузка приводит к статистически достоверному снижению радиоактивного фосфора в ткани левого желудочка на 5, 10, 16 и 30-й дни после ваготомии. Наиболее низкая относительная активность ткани левого желудочка отмечается на 30-й день после перерезки блуждающего нерва. Вместе с тем и у интактных животных физическая нагрузка статистически достоверно снижает включение радиоактивного фосфора в ткань левого желудочка.

Важно отметить, что в условиях интенсивной мышечной работы статистически достоверной разницы между включением радиоактивного фосфора

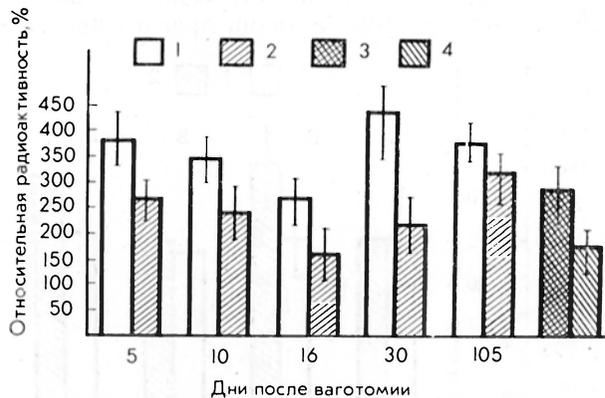


Рис. 3. Включение радиоактивного фосфора в ткань левого желудочка ваготомированных крыс в условиях физической нагрузки.

1 — ваготомия; 2 — ваготомия + физическая нагрузка; 3 — контроль; 4 — контроль + физическая нагрузка.

в ткань левого желудочка интактных и ваготомированных крыс нами не обнаружено.

Таким образом, физическая нагрузка приводит к снижению включения радиоактивного фосфора в ткань левого желудочка как у ваготомированных, так и у интактных крыс. Согласно данным ряда авторов [14—16], физическая нагрузка снижает содержание катехоламинов и их предшественников как в сердце, так и в ткани надпочечников.

ЛИТЕРАТУРА

- Орбели Л. А. Избранные труды. М.—Л., 1962, т. 2, с. 467.
- Павлов И. П. — Полное собрание сочинений. М.—Л., 1961, с. 577.
- Бутенко Г. М. Влияние нервной системы на трофические и компенсаторные процессы в сердечной мышце. Автореф. дис. докт. Киев, 1970.
- Герелюк И. П., Минц С. М. — Бюлл. exper. биол., 1975, № 11, с. 8.
- Говырин В. А. — В кн.: Эволюция функций. М.—Л., 1964, с. 241.
- Чернышова Г. В., Стойда Л. В. — Бюлл. exper. биол., 1969, № 2, с. 53.
- Мсерсон Ф. З. Адаптация сердца к большой нагрузке и сердечная недостаточность. М., 1975.
- Райскина М. Е., Онищенко Н. А., Шаргородский Б. М. и др. Методы прижизненного исследования метаболизма сердца. М., 1970.
- Ойвин И. А. — Пат физиол., 1960, № 4, с. 76.
- Милько В. И., Шепотин Г. М. — В кн.: Актуальные проблемы кардиологии. Киев, 1965, с. 187.
- Минц С. М., Герелюк И. П. — В кн.: Структура и функция гистогематических барьеров. М., 1971, с. 63.
- Фролькис В. В., Милько В. И. — Бюлл. exper. биол., 1959, № 7, с. 50.
- Райскина М. Е. Биохимия нервной регуляции сердца. М., 1962.
- Каминский М. И., Руденко А. А., Кононенко В. Я. — В кн.: Эндокринные механизмы регуляции приспособления организма к мышечной деятельности, Т. I. Тарту, 1969, с. 287.
- Малышева В. А., Матлина Э. Ш. — Пробл. эндокринолог., 1971, № 6, с. 84.
- Ostman I., Sjöstrand N. O., Sweden G. — Acta physiol. scand., 1972, v. 86, p. 299.

Поступила 3/1 1978 г.

DISTRIBUTION OF ^{32}P AND ATP TURNOVER IN RAT MYOCARDIUM IN PARTIAL PARASYMPATHECTOMY AND PHYSICAL LOADING

B. I. Vaniayev

Department of Pathophysiology, Medical School, Ivano-Francovsk

ATP turnover as well as incorporation of ^{32}P into various parts of myocardium were studied after left-side vagotomy and physical loading. An increase in ^{32}P incorporation was observed within 5, 10, 30, 105 days after the operation. Physical loading decreased the isotope incorporation into heart tissue of vagotomized and control animals under these conditions. The vagotomy did not alter the ATP content in rat myocardium but increased the turnover of ATP.

УДК 612.35.014.43

*М. Г. Макевнина, Е. В. Кудокочева, Г. Е. Добрецов,
А. М. Белоус*

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ПЕЧЕНИ

ИИ Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова, Москва, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков

Исследовано влияние замораживания и отогрева на способность микросом эндоплазматического ретикулума печени окислять два флюоресцирующих субстрата — НАДФ·Н и 4-диметиламинохалкон (ДМХ). Медленное охлаждение до -25°C или быстрое охлаждение до -196°C не оказывали достоверного влияния на скорость окисления НАДФ·Н после отогрева, однако способность микросом окислять ДМХ в обоих случаях снижалась. По-видимому, замораживание и последующий отогрев микросом вызывают повреждение терминальных участков цепи переноса электронов и (или) системы гидроксилирования, включающей цитохром Р-450. Медленное охлаждение до -25°C значительно сильнее повреждало микросомы, чем быстрое (до -196°C).

Одним из основных способов консервации органов является низкотемпературное консервирование [1, 2]. Известно, что охлаждение или замораживание с последующим оттаиванием не проходят, однако, бесследно для органа: при этом в той или иной степени нарушаются его основные функции [2]. Установлено, что одной из главных причин таких нарушений является повреждение мембранных систем клетки [2—4]. В частности, наблюдались повреждения дыхательной цепи митохондрий [5, 6], выход гидролитических ферментов из лизосом [7, 8]. Менее известно о мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР). В работе [9] были показаны значительные нарушения ультраструктуры ЭР, особенно при медленном замораживании. Вместе с тем конкретные механизмы криоповреждения ЭР остались неясными. Целью данной работы было изучение влияния различных режимов замораживания и отогрева на функции мембран ЭР печени крыс.

Методика

В работе использовали белых крыс-самцов массой 180—200 г. После суточного голодания крыс декантитировали, печень перфузировали перед гомогенизацией для удаления крови. Фракцию общих микросом ЭР выделяли, как в работе [10], и затем хранили и инкубировали в растворе 16 мМ MgCl_2 — 40 мМ трис-НСI рН 7,4. Концентрация микросом в среде инкубации составляла 0,8 мг белка на 1 мл. Количество белка определяли по методу Лоури [11].

Кинетику окисления НАДФ·Н и 4-диметиламинохалкона (ДМХ) исследовали флюорометрически. Флюоресценцию НАДФ·Н возбуждали при 365 нм, ДМХ — при 404 нм и измеряли ее соответственно при 435 и 510 нм на установке, описанной ранее [12].

Использовали два режима замораживания: 1) быстрое погружение стеклянной ампулы с 1,5 мл суспензии микросом в жидкий азот, в результате чего температура снижалась до -196°C со скоростью около $300-400^{\circ}\text{C}$ в минуту; 2) помещение ампулы с термо-

парой в пары азота и охлаждение до -25°C со скоростью 1°C в минуту. Отогрев производили в водяной бане (37°C), ампулы при отогреве вращали. Использовали препараты НАД·Н и НАДФ·Н фирмы «Реанал» (Венгрия). Статистическую обработку результатов проводили, используя критерий достоверности Стьюдента.

Результаты

Как известно, первым этапом процесса переноса электрона в ЭР печени является окисление НАДФ·Н или НАД·Н флавопротеидом. Окисление этих субстратов может быть зарегистрировано по снижению их флюоресценции. Данные о скорости окисления НАДФ·Н, полученные на интактных митохондриях и митохондриях, подвергнутых замораживанию, представлены в таблице. Видно, что после замораживания и отогрева скорость окисления НАДФ·Н несколько снижается, особенно в случае медленного замораживания до -25°C . Однако это снижение недостоверно при $P=0,1$.

Окисление НАДФ·Н и ДМХ митохондриями, подвергнутыми замораживанию и отогреву

Характер замораживания	Скорость окисления, нмоль/мин/мг*	
	НАДФ·Н	ДМХ
Контроль	$9,7 \pm 1,3$	$0,15 \pm 0,03$
Медленное замораживание, 1°C в минуту, до -25°C P	$9,1 \pm 1,4$ $> 0,1$	$0,08 \pm 0,02$ $< 0,05$
Быстрое замораживание, $300-400^{\circ}\text{C}$ в минуту, до -196°C P	$8,2 \pm 1,1$ $> 0,1$	$0,12 \pm 0,05$ $< 0,1$

* Величины дисперсий указаны для абсолютных значений скоростей окисления, а величины P рассчитаны для относительных различий между опытным и контрольным образцом. Число опытов $n = 7$.

различных экзогенных соединений, включающую цитохром $P=450$. В качестве такого экзогенного субстрата митохондриального окисления мы использовали флюоресцентный зонд ДМХ [12, 13]. При добавлении ДМХ в суспензию митохондрий происходит его окисление, которое сопровождается исчезновением флюоресценции (рис. 1). Скорость окисления ДМХ зависит от присутствия НАД·Н или НАДФ·Н: при наличии НАД·Н начальная скорость окисления ДМХ увеличивается в $1\frac{1}{2}$ раза, а

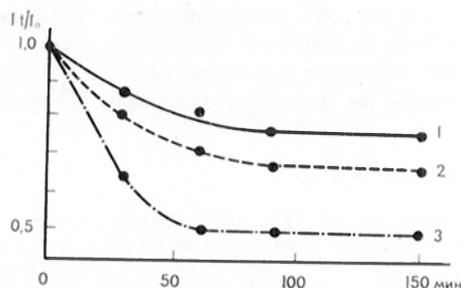


Рис. 1. Кинетика окисления ДМХ (10 мкМ) в суспензии митохондрий печени крысы (0,8 мг/мл) при 37°C .

Среда инкубации: 1 — 16 мМ MgCl_2 , — 40 мМ трис-НСI pH 7,7; 2 — то же + 0,6 мМ НАД·Н; 3 — то же + 0,5 мМ НАДФ·Н; I_0 и I_t — интенсивность флюоресценции ДМХ в начальный момент и через t мин после начала инкубации соответственно.

По-видимому, замораживание не вызывает значительных нарушений первых участков цепи переноса электрона. Поэтому было необходимо исследовать конечные участки этой цепи, особенно активность системы окисления

По-видимому, замораживание не вызывает значительных нарушений первых участков цепи переноса электрона. Поэтому было необходимо исследовать конечные участки этой цепи, особенно активность системы окисления

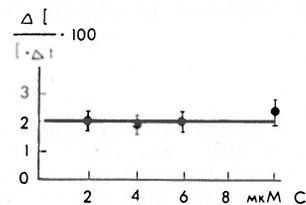


Рис. 2. Зависимость доли окисленного ДМХ от его исходной концентрации (c) в суспензии митохондрий.

c — изменения концентрации ДМХ за время t его окисления митохондриями. Остальные условия, как на рис. 1 (3).

НАДФ·Н — в 3 раза (скорость окисления постепенно падает, поскольку снижается содержание восстановленных НАД·Н или НАДФ·Н). Доля окисленного ДМХ не зависит от его концентрации в суспензии микросом (рис. 2). Окисление ДМХ, по-видимому, не связано с происходящим в микросомах перекисным окислением липидов: контрольные опыты показали, что в суспензии фосфолипидов даже при перекисном окислении, индуцированном ионами Fe^{2+} , разрушения ДМХ не происходило.

Очевидно, разрушение ДМХ в микросомах обусловлено функционированием их окислительной системы, а скорость исчезновения флюоресценции ДМХ определяется только активностью этой системы.

Данные о влиянии замораживания на окисление ДМХ микросомами представлены в таблице. Как видно, скорость окисления ДМХ значительно и достоверно снижается после замораживания и отогрева микросом, особенно в случае медленного замораживания до $-25^{\circ}C$.

Обсуждение результатов

Таким образом, полученные результаты показывают, что замораживание с последующим отогревом вызывает нарушение функционирования микросом ЭР печени. В большей степени повреждаются, по-видимому, терминальные участки цепи переноса электронов и (или) система гидроксилрования, включающая цитохром P-450. Достоверного повреждения начальных участков цепи не наблюдалось. Кроме того, повреждение значительно более выражено при медленном замораживании до $-25^{\circ}C$, чем при быстром до $-196^{\circ}C$. Подобная же ситуация наблюдалась при замораживании митохондрий [14, 15]. Сам факт повреждения мембран при замораживании может объясняться их дегидратацией и концентрированием электролитов около их поверхности [16]. Однако причины различий в повреждающем действии медленного и быстрого замораживания в настоящее время неясны. Возможно, в первом случае мембраны дольше экспонируются в среде с повышенной концентрацией электролитов, что и обуславливает большее повреждение [17]. Существует и другая возможность. Фазовый переход липидов микросом, который происходит при низких температурах, должен вызывать перераспределение белков в мембране [18]. Перераспределение — процесс диффузный, и его результат зависит от времени экспонирования мембран при низкой температуре. Возможно, что при быстром замораживании перераспределение белков невелико и поэтому обратимо, а при медленном — необратимо.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Опищенко Н. А. Консервация органов. М., 1975, с. 78.
2. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. Киев, 1975, с. 149.
3. Белоус А. М., Луговой В. И., Гулевский А. К. — В кн.: Криобиология и криомедицина. Киев, 1975, вып. 1, с. 8.
4. Heber U. — *Cryobiology*, 1968, v. 5, p. 188.
5. Lusepa S., Dass S. — *Canad. J. Biochem.*, 1966, v. 44, p. 775.
6. Білоус А. М., Лемешко В. В. — *Укр. біохім. ж.*, 1974, № 3, с. 368.
7. Persidsky M. — *Cryobiology*, 1971, v. 8, p. 482.
8. Tappel A. — In: *Cryobiology*. New York, 1966, p. 163.
9. Shegman T., Lin K. — *Cryobiology*, 1973, v. 10, p. 104.
10. Арчаков А. И., Панченко Л. Ф., Карузина И. И. и др. — *Биохимия*, 1969, т. 34, с. 604.
11. Lowry O., Rosenbrought R., Farr A. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265.
12. Добрецов Г. Е., Петров Г. Е., Девя А. И. и др. — *Биофизика*, 1975, т. 20, с. 1014.
13. Добрецов Г. Е. — В кн.: Молекулярная биология. М., 1975, т. 6, с. 34.
14. Лемешко В. В. — *Науч. докл. высш. школы. Биол. науки*, 1975, № 2, с. 56.
15. Лемешко В. В., Белоус А. М. — В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, с. 147—151.
16. Loveloch T. — *Proc. roy. Soc. London, B.*, 1957, v. 147, p. 427.
17. Loveloch T. — *Brit. J. Haemat.*, 1955, v. 1, p. 117.
18. Singer S. *Ann. Rev. Biochem.*, 1974, v. 43, p. 805.

Поступила 30/IX 1977 г.

EFFECT OF LOW TEMPERATURE ON THE FUNCTIONAL STATE OF MEMBRANES FROM LIVER ENDOPLASMIC RETICULUM

M. G. Makevina, E. V. Kudokotseva, G. E. Dobretsov, A. M. Belous

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow, Institute of Cryobiological and Cryomedical Problems, Kharkov

Oxidation of fluorescent substrates — NADPH and 4-dimethylamine chalcone (DMC) by microsomes from liver endoplasmic reticulum was studied after freezing and thawing of these cell organelles. Slow freezing to -25° or quick freezing to -196° did not affect distinctly the rate of NADPH oxidation after thawing, but oxidation of DMC by microsomes was decreased in both cases. Freezing and subsequent thawing of microsomes impaired apparently the terminal sites of electron transfer and/or the systems of hydroxylation, including cytochrome P-450. Slow freezing to -25° impaired microsomes more markedly than quick freezing to -196° .

УДК 615.355:577.152.3111.012.6

*А. П. Бресткин, М. М. Вязьменская, М. А. Дембо,
Е. Б. Майзель, И. И. Райхер, М. Е. Спиридонов,
А. Г. Фарцейгер*

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТОВ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград;
Пермский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток; Ленинградский институт гематологии и переливания крови*

Предложена модификация метода выделения ацетилхолинэстеразы из эритроцитов человека (АХЭЭЧ) с введением дополнительной очистки гель-фильтрацией на сефадексе Г-75. При этом за счет удаления балластных низкомолекулярных белков и продуктов разрушения гемоглобина повышается удельная активность препаратов АХЭЭЧ и они освобождаются от тромбопластической активности. Примесь изоантигенов А и В в них невелика, а качество гемоглобина, связанного в комплексах с другими белками в форме оксигемоглобина, не превышает 12% общего количества белка.

В последние годы появилось значительное число работ [1—4], указывающих на возможность использования различных препаратов холинэстераз при лечении травматического и ожогового шока в эксперименте [5, 6] и клинике [7]. В большинстве случаев авторы использовали препараты пропионилхолинэстеразы с достаточно высокой удельной активностью — до 90 ед/мг [4, 5].

Представляется целесообразным применение для этих целей препаратов АХЭЭЧ как наиболее физиологичных для организма больного. Возможность получения фермента обеспечивается наличием большого количества донорских эритроцитов человека, остающихся при производстве препаратов из сыворотки крови.

В Пермском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток (НИИВС) разработан и внедрен в производство промышленный метод получения частично очищенных препаратов АХЭЭЧ с удельной активностью от 0,5 ед/мг [8], основанный на обработке лиофилизированной стромы эритроцитов органическими растворителями с последующим экстрагированием АХЭЭЧ фосфатным буфером и очисткой кислотным осаждением, дробным выслаиванием сульфатом аммония и гель-фильтрацией на сефадексе Г-25.

В настоящей работе рассмотрена возможность дополнительной очистки выпускаемых препаратов и в сравнительных опытах изучено содержание в них гемоглобина, групповых антигенов и тромбопластических веществ.

Методика

Исследовано 3 серии препаратов АХЭЭЧ производства Пермского НИИВС. Гель-хроматографию проводили на сефадексах Г-100 и Г-75 по известным методикам [9]. Содержание белка в исходных препаратах определяли по Лоури [10], гемоглобина — бензидиновым методом [11]. Во фракциях, полученных при гель-фильтрации, белок и гемоглобин измеряли на спектрофотометре СФ-18 при 280 и 413 нм соответственно. Колонки с сефадексами уравнивали 0,07 М фосфатным буфером рН 7,5, содержащим 0,9% NaCl. Элюцию вели тем же раствором.

Активность АХЭЭЧ рассчитывали по модифицированному методу Элмана [12] с использованием фотоэлектроколориметра ФЭНК-57 и термостатированной кюветы. Скорость ферментативного гидролиза ацетилтиохолина измеряли по нарастанию оптической плотности при 413 нм и 25°C в реакционной смеси, содержащей 0,05 М фосфатный буфер рН 7,5, $5 \cdot 10^{-4}$ М, раствор 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) фирмы «Koch-Laboratories» (Англия), 10^{-3} М раствор ацетилтиохолинбромида фирмы «Sigma» (Чехословакия), 0,9% NaCl и разные количества АХЭЭЧ.

Для оценки тромбопластических свойств АХЭЭЧ фиксировали время рекальцификации, тромбиновое время, время лизиса эуглобулинового сгустка и содержание фибриногена — с помощью известных методов [13]. Наличие групповых антигенов в препаратах определяли, истощая ими групповые сыворотки, с агглютинацией последних эритроцитами А(II) и В(III) [14]. За условную терапевтическую дозу АХЭЭЧ принимали 16—20 ед. на 1 кг массы тела [1, 6]. Дозу на 1,0 мл плазмы рассчитывали с учетом объема циркулирующей крови и показателя гематокрита.

Результаты и обсуждение

Выпускавшиеся Пермским НИИВС до 1975 г. препараты АХЭЭЧ имели интенсивную окраску за счет примеси гемоглобина. Согласно проведенным нами исследованиям (см. таблицу), препарат III серии содержит 5,5% ге-

Содержание гемоглобина в препаратах АХЭЭЧ различной степени очистки ($M \pm m$)

Серия	Удельная активность (по паспорту)	Дата выпуска	Количество, мг на 1 мг навески		% гемоглобина	
			белка	гемоглобина	от общего белка	на 1 ед. активности в 1 мг
III	0,7	28/IX 1971 г.	$0,65 \pm 0,02$	$0,036 \pm 0,001$	5,5	7,8
XV	2,3	25/IV 1975 г.	$0,64 \pm 0,09$	$0,077 \pm 0,002$	11,9	5,2
XVI	4,1	2/VIII 1975 г.	$0,56 \pm 0,04$	$0,033 \pm 0,001$	5,9	1,5

моглобина от общего количества белка, которое составляет лишь 65% массы препарата. Поскольку завершающей лиофильной сушке подвергаются растворы АХЭЭЧ в 0,002 М фосфатном буфере рН 7,8 с активностью 10—30 ед/мл, содержание солей в коммерческих препаратах может достигать 10% по массе. Оставшиеся 25%, вероятно, представляют собой липидный и полисахаридный компоненты эритроцитарной мембраны.

Из сравнения спектров поглощения препарата АХЭЭЧ и оксигемоглобина человека следует, что первый имеет весьма интенсивную полосу поглощения при 413 нм, практически совпадающую с полосой Сорэ для оксигемоглобина (414 нм) [15], но не обладает характерными для оксигемоглобина максимумами при 541 и 576 нм. Отсюда можно заключить, что гемоглобин присутствует в препарате в форме оксигемоглобина, а отсутствие двух полос поглощения в длинноволновой области спектра, возможно, связано с влиянием на спектральные свойства оксигемоглобина сопутствующих белков.

Поскольку, по литературным данным, молекулярные массы гемоглобина [15] и АХЭЭЧ [16] значительно отличаются друг от друга (соответственно 67 000 и 260 000), можно было надеяться освободиться от низкомолекулярных белков и гемоглобина гель-фильтрацией на колонке с сефадексом Г-100, для которого предел эффективного фракционирования глобулярных белков равен 100 000.

Как показано на рис. 1, большая часть гемоглобина выходила в первом пике, элюировавшемся в свободном объеме колонки и совпадавшем с пиком активности АХЭЭЧ. Второй, частично отделившийся от первого, пик также содержал одновременно и гемоглобин, и АХЭЭЧ. Лишь третий пик обладал оптической плотностью при 413 нм, но не имел холинэстеразной активности. Полученные данные свидетельствовали о том, что в исследованном препарате молекулы гемоглобина были в виде сложных комплексов либо друг с другом, либо с молекулами АХЭЭЧ и других белков стромы эритроцитов. Только часть сопутствующих белков, находившихся в тре-

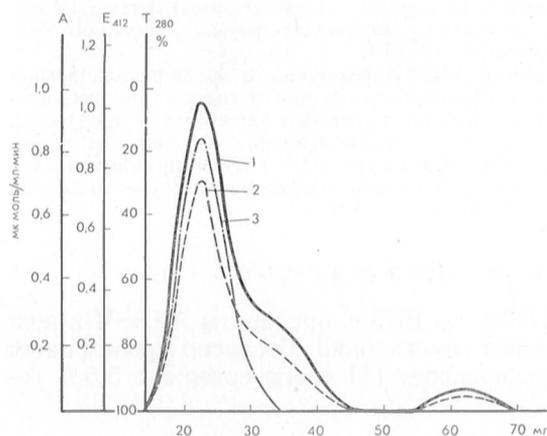


Рис. 1. Гель-хроматография препарата АХЭЭЧ на сефадексе Г-100.

1 — оптическая плотность при 412 нм; 2 — оптическая плотность при 280 нм; 3 — холинэстеразная активность.

мом колонки основного пика, содержавшего АХЭЭЧ и гемоглобин, имелся второй пик, не обладавший холинэстеразной активностью, но с оптической плотностью в полосе поглощения гемоглобина при 413 нм. Спектр поглощения этой фракции был аналогичен таковому оксигемоглобина с характерными максимумами при 413, 541 и 576 нм, что подтверждает высказанное выше предположение о влиянии образования комплексов гемоглобина с сопутствующими белками на его спектральные свойства и исчезновение, в связи с этим в препаратах АХЭЭЧ максимумов поглощения при 541 и 576 нм. Сделанные на основании объема элюции второго пика с колонки ориентировочные расчеты указывают на примерный молекулярный вес этой фракции в пределах от 13 000 до 17 000. По-видимому, эта фракция содержит некоторые низкомолекулярные белки, а также субъединицы гемоглобина или продукты его распада, образовавшиеся в процессе выделения препарата.

Высокая скорость элюции и стабильность работы колонки с сефадексом Г-75, а также возможность сочетания в одной операции дальнейшей очистки препаратов АХЭЭЧ и их обессоливания перед завершающей лиофильной сушкой явились вескими основаниями для включения в 1975 г. стадии гель-фильтрации на колонке с сефадексом Г-75 в производственный регламент.

Приведенные в таблице данные об абсолютном и относительном содержании гемоглобина в препаратах XV и XVI серий, выпущенных Пермским НИИВС по модифицированной технологии, показывают, что при гель-фильтрации на сефадексе Г-75 количество гемоглобина в препаратах по существу не снижается и составляет 5,5—11,9% общего содержания белка. Но поскольку доля ферментного белка при этом повышается, содержание

третьем пике, могла быть отделена от препарата методом гель-фильтрации без потери АХЭЭЧ. Таким образом, гель-фильтрация на сефадексе Г-100 не позволяет избавиться от гемоглобина. Кроме того, использование колонок с сефадексом Г-100 в производственных условиях нежелательно ввиду низкой скорости фильтрации. Более производительные колонки с сефадексом Г-75 позволяют освободиться от содержащихся в третьем пике (см. рис. 1) балластных веществ с выходом АХЭЭЧ не менее 90%.

Типичная кривая элюции с колонки с сефадексом Г-75 приведена на рис. 2, из которого видно, что, помимо выходящего со свободным объе-

гемоглобина, приходящегося на одну единицу активности АХЭЭЧ, заметно уменьшается; например, раствор препарата XVI серии по сравнению с препаратом III серии при одинаковой активности был в 5 раз слабее окрашен.

Препарат III серии, не прошедший дополнительной очистки, по тромбопластическим свойствам резко отличался от двух других. В нем даже в условных терапевтических дозах не удавалось определить время рекальцификации и лизиса эритроцитного сгустка, тромбиновое время и содержание фибриногена, так как в опытных пробах при добавлении АХЭЭЧ III се-

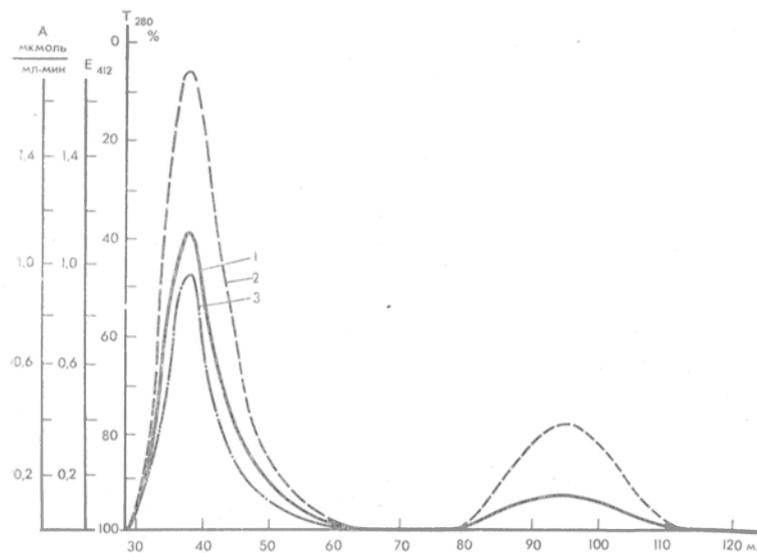


Рис. 2. Гель-хроматография препарата АХЭЭЧ на сефадексе Г-75. Обозначения те же, что на рис. 1.

рии плазма свертывалась. При анализе препаратов XV и XVI серий показатели свертывающей системы крови практически не отличались от контроля. Аналогичная картина наблюдалась и при увеличении использованных концентраций АХЭЭЧ в 5 и 25 раз.

Таким образом, во втором белковом пике (рис. 2), содержащем продукты распада гемоглобина и низкомолекулярные белки, по-видимому, находятся также факторы, ответственные за тромбопластическую активность. Включение в производственный регламент стадии гель-фильтрации на сефадексе Г-75 в настоящее время позволяет получать препараты, не обладающие тромбопластической активностью.

В ацетилхолинэстеразе, выделенной из форменных элементов крови, весьма вероятно также наличие групповых антигенов, представляющих собой высокомолекулярные гликопротеиды, тесно связанные со строной эритроцитов. Поскольку для получения АХЭЭЧ используются эритроциты из смеси донорской крови, можно ожидать, что препарат будет содержать оба изоантигена А и В.

Для проверки этого предположения препаратами АХЭЭЧ всех исследованных серий истощали контрольные сыворотки, причем в последних было зафиксировано падение титров на одно разведение. Это свидетельствовало о наличии изоантигенов как в неочищенных препаратах, так и в тех, которые были подвергнуты гель-фильтрации на сефадексе Г-75, поскольку высокомолекулярные примеси в данном случае не могли быть отделены от фермента. С помощью реакции гемагглютинации было проведено сравнительное определение содержания изоантигена А в препаратах III и XV серий и в выпускаемой Пермским НИИВС противостолбнячной сыворот-

ке «Диаферм-3», используемой в медицине. Оказалось, что при сравнении терапевтических доз препаратов АХЭЧ, т. е. из расчета 20 ед. на 1 кг массы, препарат XV серии содержал изоантигена А в 5 раз меньше профилактической и в 100 раз меньше лечебной дозы противостолбнячной сыворотки «Диаферм-3». Препарат III серии содержал в 5 раз больше изоантигена А, чем препарат XV серии, однако даже в этом случае при сравнении терапевтических доз количество изоантигена А в нем было намного ниже, чем в сыворотке «Диаферм-3».

В результате выполненной работы в производственный метод выпуска препарата АХЭЧ введена дополнительная модификация, что позволило получить препараты, которые не обладают тромбoplastическими свойствами, содержат сравнительно небольшие количества изоантигенов А и В и не более 12 % гемоглобина от общего содержания белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулагин В. К., Давыдов В. В., Ермаков А. М. — Вестн. хир., 1969, № 1, с. 76. — 2. Яременко Б. Р. — В кн.: Травматический шок. Л., 1970, с. 159. — 3. Базаревич Г. Я., Богданович У. Я., Лихтенштейн А. О. — Казанск. мед. ж., 1972, № 6, с. 75. — 4. Бресткин А. П., Данилов А. Ф., Кулагин В. К. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии. 2-й. Материалы. Душанбе, 1974, с. 137. — 5. Базаревич Г. Я., Кириллов А. Л., Романенко Т. Н. — Пат. физиол., 1976, № 3, с. 12. — 6. Кочетыгов Н. И., Дембо М. А., Чаплыгина З. А. и др. — В кн.: Травматический шок. Л., 1976, с. 53. — 7. Базаревич Г. Я., Богданович У. Я., Лихтенштейн А. О. — Ортопед., травматол., 1973, № 4, с. 34. — 8. Абрамович Т. Д., Бресткин А. П., Борзунина А. М. и др. А. с. 507582 (СССР). Открытия, 1976, № 11. — 9. Детерман Г. — Гель-хроматография. М., 1970, с. 160—164. — 10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265. — 11. Рождественская М. А. — В кн.: Актуальные вопросы переливания крови. Л., 1955, вып. 4, с. 55. — 12. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. et al. — Biochem. Pharmacol., 1961, v. 7, p. 88. — 13. Исследование факторов свертывания крови. Метод. указания. Л., 1976. — 14. Лабораторные методы исследования в неинфекционной иммунологии. Под ред. проф. О. Е. Вязова. М., 1967, с. 76, 87. — 15. Блюменфельд Л. А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. М., 1957, с. 51. — 16. Sihotani K. — J. Biochem. (Tokyo), 1976, v. 75, p. 939.

Поступила 1/IX 1977 г.

SOME PROPERTIES OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM HUMAN ERYTHROCYTES

A. P. Brestkin, M. M. Vyaz'menskaya, M. A. Dembo, E. B. Maysel, I. I. Raykher, M. E. Spiridonov, A. G. Fartzeyger

I. M. Sechenov Institute of Evolutional Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Leningrad, Research Institute of Vaccines and Blood Sera, Perm

A modified method is described for isolation of acetylcholinesterase from human erythrocytes using an additional step of gel filtration on Sephadex G-75. Preparations of acetylcholinesterase were liberated from thromboplast activity and their specific activity was increased due to removal of low molecular proteins and of the products of destruction of hemoglobin. Content of A and B isoantigens in the preparations obtained was rather low and content of hemoglobin, combined with other proteins in the form of oxyhemoglobin, did not exceed 12% of the total protein.

Г. В. Хомулло, В. М. Травкина, Т. И. Рыжова, Г. А. Кокорева

СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВОГО И МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА ПРИ ВВЕДЕНИИ ТИРОКАЛЬЦИТОНИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

Кафедра биологии с общей генетикой Калининского медицинского института

Изучено влияние гормона щитовидной железы тирокальцитонина (ТКТ) на минеральный и белковый обмен. Установлено, что продолжительное введение препарата вызывает понижение содержания кальция и фосфора в крови, повышение активности щелочной фосфатазы, уменьшение экскреции оксипролина и усиление выведения аминокислот с мочой. Применение ТКТ на фоне экспериментальной костной травмы вызывает более стойкую гипокальциемию и фосфатемию, значительную активизацию щелочной фосфатазы и экскреции аминокислот. Количество экскретируемого оксипролина остается ниже нормы, но несколько выше, чем при введении гормона интактным животным. Отмеченные изменения характеризуются фазностью, коррелирующей с определенными этапами репаративного остеогенеза.

Среди факторов, стимулирующих репаративные процессы в различных тканях, особое место занимают гормоны желез внутренней секреции [1—3]. Обладая специфичностью в отношении влияния на метаболизм, пролиферацию и дифференцировку клеток, они определяют скорость и характер посттравматической регенерации [4—6]. Выраженным стимулирующим эффектом на заживление костных переломов обладает и гормон тирокальцитонин (ТКТ), продуцируемый С-клетками щитовидной железы [7]. Регулируя кальциевый и фосфорный обмен, он оказывает ингибирующее влияние на остеокластическую резорбцию костной ткани и тем самым повышает скорость формообразовательных процессов [8, 9]. Вместе с тем механизмы действия этого гормона на посттравматическую регенерацию изучены еще недостаточно. В этой связи представляло интерес проследить закономерности в изменении уровня минерального и белкового обмена в организме при гормональном воздействии в условиях репаративного остеогенеза.

М е т о д и к а

Опыты проведены на 192 беспородных белых крысах массой 150—185 г. Поставлены 4 серии опытов: I — интактные животные; II — крысы, которым внутрибрюшинно вводили ТКТ в дозе 5 ЕД/сут на 1 животное; III — крысы, которым производили однотипно перелом диафиза правой большеберцовой кости; IV — крысы, получавшие после аналогичного повреждения ТКТ (перелом+ТКТ). В работе использован отечественный препарат ТКТ, полученный во Всесоюзном научно-исследовательском институте технологии кровезаместителей и гормональных препаратов из свежемороженой щитовидной железы крупного рогатого скота. Методика введения и дозировка ТКТ выбраны на основании данных, полученных ранее [10]. Биохимические исследования проводили через 5, 10, 15, 20, 25 и 30 дней от начала повреждения. Неорганический фосфор и активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови определяли по стандартным методам — для суждения о влиянии ТКТ на метаболизм органических компонентов костной ткани изучали выведение с мочой специфического продукта катаболизма коллагена оксипролина. Биохимическим критерием общего белкового обмена служило изучение количества экскретируемого аминокислоты [11—12].

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

Как показали сравнительные данные наших исследований, исходный уровень обмена имеет решающее значение в ответной метаболической реакции организма на гормональное воздействие. У интактных животных показатели минерального и белкового обмена в течение опыта колебались в незначительных пределах (см. таблицу).

При введении ТКТ отмечалась гипокальциемия и гипофосфатемия, особенно четко выраженные в первые сроки наблюдения. В этих условиях происходит повышение активности щелочной фосфатазы и снижение экскре-

Концентрация кальция, неорганического фосфора и щелочной фосфатазы в сыворотке крови, мг%

Исследуемый показатель	Условия опытов	День исследования					
		5-й	10-й	15-й	20-й	25-й	30-й
Кальций	Интактные	9,75±0,76	10,28±0,34	9,84±0,31	9,28±0,55	9,68±0,32	9,25±0,24
	ТКТ	8,06±0,47	8,74±0,16	8,43±0,22	7,60±0,76	8,34±0,47	8,19±0,25
	P	>0,05	<0,001	<0,01	>0,05	<0,05	<0,01
	Перелом	11,29±1,15	11,82±0,65	11,33±0,21	10,43±0,63	10,08±0,37	10,36±0,31
Перелом + ТКТ	8,47±0,96	8,90±0,53	9,06±0,45	8,86±0,48	7,93±0,45	7,90±0,12	
	P	>0,05	<0,01	<0,001	>0,05	<0,01	<0,001
Неорганический фосфор	Интактные	4,16±0,26	3,8±0,40	3,89±0,25	3,92±0,20	4,02±0,29	3,88±0,36
	ТКТ	3,54±0,34	3,11±0,16	3,18±0,27	3,29±0,38	3,48±0,36	3,48±0,32
	P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	Перелом	4,56±0,36	4,11±0,88	4,64±0,35	3,31±0,42	3,86±0,30	4,08±0,13
Перелом + ТКТ	4,17±0,29	3,27±0,31	3,87±0,22	3,38±0,28	3,40±0,46	3,59±0,88	
	P	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Щелочная фосфатаза	Интактные	2,1±0,40	2,2±0,69	2,7±0,09	2,1±0,30	2,4±0,25	2,3±0,08
	ТКТ	2,6±0,29	3,0±0,14	3,1±0,49	2,8±0,92	3,1±0,03	2,8±0,59
	P	0,03	0,05	0,03	0,02	0,01	0,05
	Перелом	3,5±0,23	3,8±0,72	4,2±0,56	4,5±0,61	3,8±0,70	3,2±0,22
Перелом + ТКТ	4,3±0,38	5,1±0,22	5,3±0,44	4,6±0,29	3,6±0,12	2,2±0,52	
	P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,02	>0,05	>0,05

ции оксипролина, уровень которой через 20 дней стабилизировался и был значительно ниже, чем у интактных крыс (рис. 1). Выделение с мочой аминокислота под влиянием ТКТ после кратковременного снижения сменялось гипераминоазотурией с тенденцией к нормализации в последующие сроки (рис. 2).

Репаративный процесс существенно изменял показатели метаболизма в организме животных. Сопоставляя данные биохимического анализа с морфологической картиной заживления костных переломов, можно отметить определенную корреляцию между основными этапами остеогенеза и уровнями белкового и минерального обмена. Нанесение перелома вызывало не-

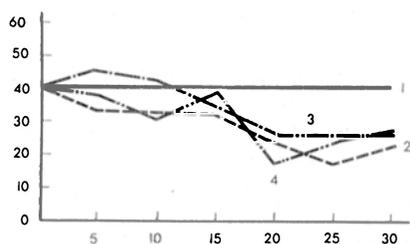


Рис. 1. Динамика экскреции оксипролина в условиях введения ТКТ при регенерации костной ткани.

Здесь и на рис. 2: 1 — интактные животные; 2 — введение ТКТ; 3 — животные с переломом; 4 — перелом + ТКТ. По оси абсцисс — день введения препарата; по оси ординат — экскреция оксипролина (в мг/сут).

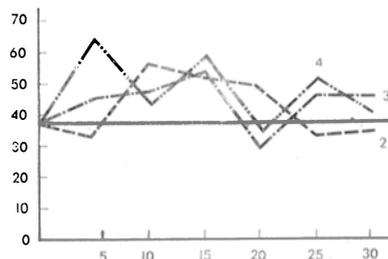


Рис. 2. Динамика экскреции аминокислота в условиях введения ТКТ при регенерации костной ткани.

По оси абсцисс — день введения препарата; по оси ординат — экскреция аминокислота (в мг/сут).

которую оксипролинурию в первые 5 дней. В последующие сроки количество оксипролина снижалось до нормы, и с 15-го дня уровень его был более низким по сравнению с таковым у интактных животных. Повышение экскреции оксипролина в этом случае следует, очевидно, объяснить преобладанием распада тканевых белков над синтезом, так как первая фаза восстановительного процесса характеризуется нарушением клеточных структур и преобладанием явлений деструкции. Усиление анаболических реакций во второй фазе регенерации характеризуется снижением количества оксипролина.

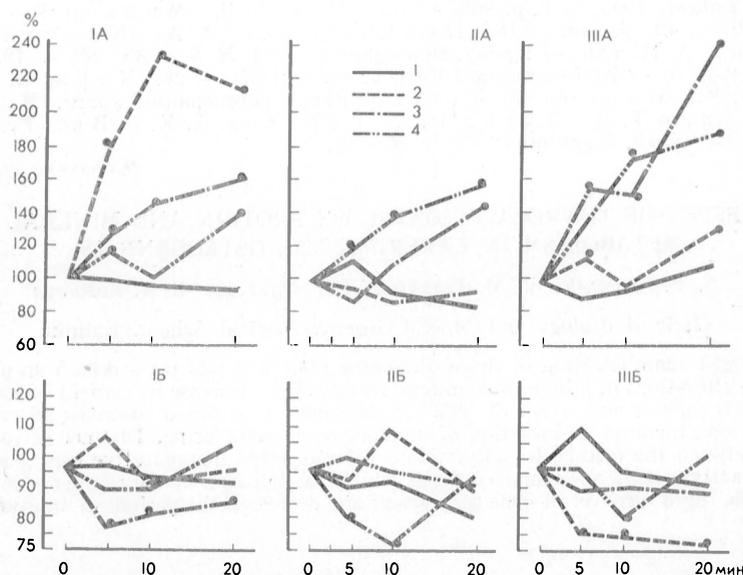
Репаративный процесс вызывал постепенное повышение экскреции аминокислота, достигающей максимального значения через 15 дней, что свидетельствует об усилении белкового обмена и совпадает с периодом формирования соединительнотканной мозоли. В этот срок заметно повышалось общее количество макроэлементов в сыворотке крови. Этот феномен, очевидно, связан с местным ацидозом в области повреждения, переходом кальция в раствор и поступлением его в оттекающую от костных отломков кровь и лимфу [13]. Одновременное увеличение концентрации фосфора, вероятно, следует объяснить рассасыванием костных фрагментов. Предполагается, что органический фосфор выделяется из разрушенных клеток и расщепляется до неорганических солей под влиянием фосфатазы. Высокая концентрация щелочной фосфатазы связана с усилением синтеза тканевых фосфатаз как в печени, так и в регенерате кости [14]. Во время перелома происходят интенсивная мобилизация фермента и транспортировка его в зону повреждения.

В период формирования хондроидно-хрящевой и первичной костной мозолей (20—30 дней от начала опыта) наблюдалось снижение содержания кальция и фосфора в сыворотке крови. Биохимические показатели в этот период исследования адекватны увеличению количества остеобластов при реконструкции мозоли в костную и отложению в структурах регенерата необходимых для остеогенеза солей кальция и фосфора [15]. Одновремен-

инактивировать эти медиаторы. Между тем вопрос об инактивации биогенных аминов при бактериальных интоксикациях в литературе не изучен. Нами поставлена цель изучить способность органов пищеварительной системы инактивировать экзогенный серотонин при экспериментальной дизентерийной интоксикации.

Методика

Опыты поставлены на 32 кроликах-самцах массой 1,8—2,6 кг. Для воспроизведения дизентерийной интоксикации использован фенольный экстракт шигеллы Зонне (серия 3), полученный из Московского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. Токсин инъецировали под кожу спины в дозе 1,2 мг/кг. Эксперименты проводили через 20—24 ч после введения яда на фоне выраженного колитического синдрома и лихорадочной реакции. У кроликов спустя 20—30 мин после внутривенной



Содержание биогенных аминов в венозной крови кроликов после введения серотонина. I — нижняя полая вена; II — воротная вена; III — печеночная. А — содержание серотонина, Б — гистамина. 1 — контроль + физиологический раствор; 2 — контроль + серотонин; 3 — дизентерийная интоксикация + серотонин; 4 — дизентерийная интоксикация + ипразид + серотонин. Точкой помечены показатели, достоверно отличающиеся от исходных.

инъекции нембутала (40 мг/кг) вскрывали брюшную полость и брали по 2 мл крови из нижней полой, воротной и печеночной вен для определения гистамина и серотонина. Затем в красную вену уха вводили подогретый до 37°C раствор серотонин-креатинин-сульфата (Венгрия) в объеме 3 мл из расчета 5 мг на 1 кг основания серотонина. Повторные пробы крови брали через 5, 10 и 20 мин после инъекции амина. В отдельной серии стравленным токсином животным вводили ипразид (отечественного производства) в дозе 50 мг/кг. Содержание серотонина и гистамина в цельной крови определяли спектрофлуорометрическими методами [7, 8]. Результаты опытов обрабатывали разностным методом с применением теста t Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Вначале была проведена I серия опытов на здоровых животных, которым вместо серотонина внутривенно вводили 3 мл физиологического раствора. Осуществление этой серии опытов диктовалось необходимостью исключить влияние условий опыта на исследуемые показатели. Как видно из рисунка, инъекция физиологического раствора не сопровождалась достоверными изменениями уровня серотонина и гистамина в крови по сравнению с исходным ($P > 0,2$; $P > 0,5$).

4. Хомулло Г. В. Репаративные процессы у животных при различных изменениях нейро-эндокринной регуляции. Дис. докт. Калинин, 1966. — 5. Травкина В. М. Заживление ран при различной насыщенности организма витамином А и введении некоторых гормонов. Дис. канд. Калинин, 1966. — 6. Кокорева Г. А. Характер и полнота восстановительного процесса в коже у животных в условиях гормонального воздействия. Дис. канд. Калинин, 1971. — 7. Хомулло Г. В. — В кн.: Биохимические исследования в травматологии и ортопедии. М., 1972, с. 157—159. — 8. Хомулло Г. В., Брискин А. И., Хусид И. Х. — В кн.: Механизмы регенерации и клеточного деления. М., 1971, с. 193. — 9. Baylink D., Morgs E., Rich S. — Endocrinology, 1969, v. 84, p. 261. — 10. Стекольников Л. И., Сумароков Д. Д., Брискин А. И. — Докл. АН СССР, 1969, т. 185, с. 483—487. — 11—12. Szentirmai A., Graun P., Horvath L. et al. — Clin. chim. Acta, 1962, v. 7, p. 459—462. — 13. Романенко В. Д. Физиология кальциевого обмена. Киев, 1975. — 14. Торбенко В. П. — В кн.: Биохимические изменения в организме при травме. М., 1959, с. 41—49. — 15. Хомулло Г. В., Брискин А. И., Хусид И. Х. и др. — В кн.: Регенерация и гистогенез тканей. Калинин, 1971, с. 92—96. — 16. Martin T., Robinson C., MacIntyre L. — Lancet, 1966, v. 1, p. 900. — 17. Hirsch P., Munson P. — Physiol. Rev., 1969, v. 49, p. 548. — 18. Прохончиков А. А., Хомулло Г. В., Брискин А. И. и др. — Пробл. эндокринологии, 1974, № 6, с. 80—85. — 19. Clark J., Kennу A. — Endocrinology, 1969, v. 84, p. 1199. — 20. Корж А. А., Белоус А. М., Панков Е. Я. Репаративная регенерация кости. М., 1972. — 21. Хомулло Г. В., Хусид И. Х., Страхов А. К. — В кн.: Регенерация и гистогенез тканей. Калинин, 1971, с. 87—92.

Поступила 28/11 1978 г.

EFFECT OF THYROCALCITONINE ON PROTEIN AND MINERAL METABOLISM IN EXPERIMENTAL OSTEOGENESIS

G. V. Khomullo, V. M. Travkina, T. I. Ryzhova, G. A. Kokoreva

Chair of Biology and General Genetics Medical School, Kalinin

Prolonged administration of thyrocalcitonine (TC) into rats (at a dose 5 un per animal) led to some alterations in protein and mineral metabolism: decrease in content of calcium and phosphorus in blood, activation of alkaline phosphatase in blood, decrease in excretion of hydroxyproline, increase in excretion of aminonitrogen with urine. Distinct correlation was observed between the metabolic activity and definite steps in reparative osteogenesis. Exogenous TC activated the cellular structures, which participated in the regenerative processes, promoted the rapid turnover of bone generations and decreased the periods of tracture healing.

УДК 616.935-092.9-07:1616.33:577.175.823.042.2

Б. З. Шенкман

ОБ ИНАКТИВАЦИИ ТКАНЯМИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И ПЕЧЕНИ СЕРТОНИНА В УСЛОВИЯХ ДИЗЕНТЕРИЙНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Кафедра патологической физиологии Саратовского медицинского института

Внутривенное введение серотонина здоровым кроликам вызывает увеличение его содержания в крови нижней полой вены, однако не изменяет его уровень в крови воротной и печеночной вен. У отравленных дизентерийным токсином животных после инъекции серотонина возрастает его концентрация во всех исследованных отделах венозной системы. При этом усиливается инактивация эндогенного гистамина. Введение ипразида одновременно с дизентерийным токсином обуславливает снижение интенсивности инактивации не только серотонина, но и гистамина.

В настоящее время установлено, что бактериальные эндотоксины *in vivo* и *in vitro* вызывают высвобождение биогенных аминов из различных тканей организма [1—4]. Некоторые авторы считают, что избыточные концентрации гистамина, серотонина и других биологически активных субстанций являются основной причиной гибели животных, отравленных эндотоксинами [5, 6]. При оценке роли биогенных аминов как медиаторов эндотоксического поражения следует учитывать, что накопление их в организме зависит не только от синтеза, но и от свойства определенных систем

но отмечаются минимальные показатели экскреции оксипролина, что является следствием ингибирования распада костного коллагена [16].

Введение ТКТ на фоне повышенных катаболических процессов у крыс с переломом конечности сдвигает оптимальные показатели метаболизма на более ранние сроки.

Действие ТКТ в условиях посттравматического остеогенеза проявлялось в сохранении стойкой гипокальциемии как по сравнению с интактными, так и с животными, имеющими перелом. Одновременно в сыворотке крови наблюдалось развитие гипофосфатемии. Максимальный эффект гормона отмечался через 10—15 дней, когда уровень неорганических фосфатов снижался более чем на 20 %, а содержание кальция в крови составляло 8,9 мг %, что на 2,92 мг % ниже, чем у животных с переломом. Проявляющийся в условиях репаративного остеогенеза гипокальциемический эффект ТКТ, видимо, обусловлен не только его антирезорбтивным действием [17, 18], но также и стимуляцией гормоном поглощения и фиксации значительной части кристаллов оксипатита в ячейках органического матрикса кости [18]. В механизме развивающейся гипофосфатемии могут иметь значение усиление под действием ТКТ процесса связывания фосфатов компонентами органического и минерального матрикса кости, а также фосфатурия, обусловленная гиперсекрецией паратиреоидного гормона окошцито-видными железами в ответ на стойкую гипокальциемию [19].

У животных IV серии опытов (перелом + ТКТ) снижение экскреции оксипролина наблюдалось в первые же дни восстановительного процесса и на всем протяжении репаративного остеогенеза его уровень оставался ниже нормы, но несколько выше, чем при введении одного гормона. Низкий уровень оксипролина и одновременное повышение активности щелочной фосфатазы через 5 дней свидетельствуют об интенсификации функциональной активности фибробластов и остеобластов, осуществляющих биосинтез межклеточной субстанции в период формирования соединительнотканной мозоли, создает условия для преципитации минеральных солей на коллагеновых фибробластах и образования ядер кристаллизации [20]. В связи с этим сокращаются сроки образования хондроидно-хрящевой и костной мозолей, которые формируются соответственно через 10 и 20 дней от начала заживления. Быстрому развитию молодой губчатой кости способствует высокая активность остеогенных клеточных элементов, в зоне скопления которых осуществляется оксификация коллагеновых волокон [21]. Благодаря специфическому эффекту гормона отчетливо проявляется усиление формообразовательных процессов и значительное сокращение сроков консолидации.

Полученные данные свидетельствуют о том, что продолжительное введение ТКТ вызывает понижение содержания кальция и фосфора в крови, повышение активности щелочной фосфатазы, уменьшение экскреции оксипролина и усиление выведения аминокислот с мочой. В процессе регенерации обнаруживается отчетливый параллелизм между оптимальными показателями минерального и белкового обмена и определенными стадиями заживления костного перелома. Усиленная пролиферация клеток мезенхимного генеза при воздействии ТКТ сочетается с ускоренной их дифференцировкой в фибробласты и остеобласты. Активность последних обеспечивает высокий уровень ферментативных реакций в процессе развития репаративного остеогенеза, что приводит к раннему построению коллагеновой матрицы, нуклеации в ней кристаллов оксипатита и тем самым способствует быстрой смене костных генераций и сокращению сроков заживления перелома.

ЛИТЕРАТУРА

1. Войткевич А. А. Восстановительные процессы и гормоны. Л., 1965. —
2. Бухонова А. И. Репаративный процесс под влиянием кортизона и других гормональных веществ. Автореф. дис. канд. Воронеж, 1960. — 3. Шлык И. П. — В кн.: Вопросы регенерации желез внутренней секреции. М., 1961, с. 39—42. —

Во II серии опытов здоровым животным вводили серотонин. На этом фоне отмечалось резкое увеличение содержания серотонина в нижней полой вене, достигавшее 232,1 % по отношению к исходному. Наибольшее накопление амина регистрировалось на 10-й минуте после инъекции препарата. В воротной вене уровень серотонина не отличался от контроля, в печеночной вене повышался до 119,2 % ($P < 0,01$). В то же время концентрация гистамина в крови нижней полой и воротной вен не претерпевала существенных изменений, тогда как в печеночной вене прогрессивно падала до 76,2 % ($P < 0,001$). Результаты данных опытов свидетельствуют о том, что введение серотонина здоровым животным стимулирует процессы инактивации не только серотонина, но и гистамина. Последнее обусловлено, по-видимому, наличием общих механизмов инактивации этих медиаторов (окислительное дезаминирование, метилирование).

У кроликов, отравленных дизентерийным токсином, исходный уровень серотонина в крови оказался почти в 3 раза ниже, чем у здоровых (0,54—0,85 мкг/мл против 1,51—1,86 мкг/мл), что соответствует опубликованным нами ранее и литературным данным о снижении содержания серотонина в крови при дизентерийной интоксикации [9—12]. Введение серотонина отравленным животным обуславливало достоверное увеличение его концентрации не только в нижней полой (до 159,8 %), но и в воротной (до 141,8 %) и печеночной (до 238,7 %) венах. В то же время у животных отмечалось снижение уровня гистамина в крови нижней полой и воротной вен (соответственно до 82,1 и 76,8 % от исходного при $P < 0,01$).

Таким образом, при дизентерийной интоксикации снижается способность тканей желудочно-кишечного тракта и печени связывать экзогенный серотонин. Однако в условиях дизентерийного поражения сохраняются определенные взаимоотношения в системе инактивации серотонина и гистамина, свойственные здоровым животным. Иными словами, стимуляция активности систем, разрушающих серотонин, сопровождается усилением инактивации и эндогенного гистамина.

Далее представляло интерес выяснить, оказывает ли воздействие на исследуемые показатели блокада одного из основных путей инактивации серотонина — окислительного дезаминирования. Для этого использовали ипразид — ингибитор моноаминоксидазы, повышающий уровень серотонина в тканях при его введении экспериментальным животным [13, 14].

На фоне инъекции кроликам ипразида одновременно с дизентерийным токсином введение серотонина вызывало относительно равномерное прогрессирующее увеличение его концентрации в крови всех исследуемых отделов венозной системы (от 139,0 до 185,7 % при $P < 0,01$). При этом уровень гистамина в крови не претерпевал существенных изменений в динамике опыта ($P < 0,2$; $P > 0,5$). Результаты данной серии экспериментов указывают, что у отравленных животных в условиях блокады моноаминоксидазы резко нарушается способность желудочно-кишечного тракта и печени метаболизировать серотонин. В то же время введение ипразида предотвращает усиление инактивации гистамина под влиянием экзогенного серотонина.

Результаты наших предыдущих [15] и настоящих исследований подтверждают данные литературы [16] о том, что ипразид *in vivo* не только блокирует моноаминоксидазу, но и существенно угнетает активность диаминоксидазы, катализирующей разрушение гистамина.

Таким образом, развитие дизентерийной интоксикации сопровождается нарушением способности органов пищеварительной системы инактивировать экзогенный серотонин. При этом на фоне введения серотонина усиливается метаболизм эндогенного гистамина. Инъекция отравленным животным ипразида приводит к снижению интенсивности инактивации не только серотонина, но и гистамина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stetson C. A. — J. exp. Med., 1951, v. 93, p. 489. — 2. Shimamoto T., Inoue M., Konishi T. et al. — Arch. int. Pharmacodyn., 1959, v. 121, p. 342. — 3. Попененкова З. А. — Бюлл. exper. биол., 1961, № 2, с. 32. — 4. Visk J. A., Mehlman B., Heiffer M. H. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1971, v. 137, p. 902. — 5. Lasch H. G. — Anesthesiol. u Resuscit., 1970, N 50, p. 1. — 6. Klein W. W. — Wien. Z. inn. Med., 1971, Bd 52, S. 436. — 7. Snyder S. H., Axelrod J., Zweig M. — Biochem. Pharmacol., 1965, v. 14, p. 831. — 8. Shore P. A., Burkhalter A., Sohn V. H. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1959, v. 127, p. 182. — 9. Davis R. B., Meeser W. R., Baileu W. L. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1961, v. 108, p. 774. — 10. Попененкова З. А. — Пат. физиол., 1962, № 2, с. 35. — 11. Герович Л. М. — В кн.: Научная сессия Астраханского мед. ин-та. 53-я. Тезисы к докладам. Астрахань, 1971, с. 61. — 12. Шенкман Б. З. — В кн.: Всесоюзная конференция по водно-солевому обмену и функции почек. 4-я. Материалы. Черновцы, 1974, с. 130. — 13. Udenfriend S., Weissbach H., Bogdanski D. F. — J. biol. Chem., 1957, v. 224, p. 803. — 14. Davila D., Palaic D., Rabadija M. et al. — Acta med. iugosl., 1973, v. 27, p. 261. — 15. Шенкман Б. З. — В кн.: Изучение экстремальных состояний. Казань, 1976, с. 77—16. Kapperl-Adler R. Aminoxidases and Methods for Their Study. New York, 1970, p. 91.

Поступила 14/IX 1977 г.

INACTIVATION OF SEROTONIN BY GASTROINTESTINAL AND LIVER TISSUES IN DYSENTERIC INTOXICATION

B. Z. Shenkman

Chair of Pathophysiology, Medical School, Saratov

Intravenous administration of serotonin into healthy rabbits was accompanied by an increase in content of serotonin in blood of vena cava inferior but the level of serotonin in blood of vena portae and vena centralis hepatis was unaltered. Concentration of serotonin was increased in all parts of the venous system studied after administration of serotonin into animals, treated with dysenteric toxin; at the same time, inactivation of endogenous histamine was stimulated. Administration of iproniazid, simultaneously with the dysenteric toxin, led to decrease in inactivation not only of serotonin, but also of histamine.

УДК 612.273.2-08:612.215.3.015.3

А. Г. Александрович, Г. В. Ананьева, А. И. Димитрова,
А. А. Константинов, Э. М. Литонян, В. В. Поступаев,
Н. А. Степаненко, Т. А. Фрунтова, Е. Г. Щетинина

О ВЛИЯНИИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ [НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ

Кафедра биохимии Хабаровского медицинского института

Изменение метаболизма легких крыс при острой гипоксии характеризуется усилением гликолитического расщепления углеводов и катаболизма белков. При гипоксическом стрессе в легких увеличивается активность альдолазы, пируваткиназы, сукцинатдегидрогеназы и 5-окситриптофандекарбоксилазы, но снижается активность гексокиназы. Активность липазы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и НАД-зависимой малатдегидрогеназы (МДГ) не изменяется, в то время как соотношение удельной активности цитоплазматической МДГ и ЛДГ снижается.

Метаболическая активность легких здорового организма и при патологии в особенности изучена крайне недостаточно. Между тем работами последних лет показано, что легкие не только участвуют в газообмене и потребляют энергию для поддержания собственной структурной и функциональной целостности, но образуют биологически активные метаболиты — амины, пептиды, простагландины и поверхностно-активные вещества [1—3]. Это определяет важность выяснения роли легких в адаптационной перестройке тканевого метаболизма. Имеется немногочисленный фактический материал относительно влияния кислородной недостаточности на некоторые стороны обмена веществ в легочной ткани [2, 4].

В настоящем сообщении представлены данные по изучению основных показателей углеводного, липидного и азотистого обмена в легких крыс на начальном этапе действия гипоксической гипоксии.

Методика

Опыты проводили на белых крысах массой 180—220 г, у которых гипоксию создавали в барокамере при разрежении атмосферного воздуха до 200 мм рт. ст. в течение 3 ч. Концентрацию глюкозы и гликогена в легких определяли ортоглюцидиновым методом [5], лактата — по Баркеру и Саммерсону [6], пирувата и сумму фосфолипидов — в модификации [7], содержание триглицеридов — по [8], неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) — по [9], холестерина — по [10], остаточного азота — колориметрическим методом [7], мочевины — реакцией с диацетилмонооксимом (биотест «Lachema»), креатина и креатинина — реакцией Яффе [7]. Дыхание срезов (50—70 мг) определяли манометрически в аппарате Варбурга с использованием в качестве субстрата окисления сукцината. Инкубационная среда (конечная концентрация в М): сукцинат — 0,015, $MgCl_2$ — 0,004, KCl — 0,05, глюкоза — 0,055, NaF — 0,012, KH_2PO_4 — 0,02; pH 7,4; газовая среда — кислород. Об интенсивности фосфорилирования судили по поглощению неорганического фосфата. Концентрацию фосфора определяли в модификации [11].

Скорость гликолиза исследовали по образованию лактата при инкубации гомогенатов с глюкозо-6-фосфатом (Г-6-Ф) или фруктозо-1,6-дифосфатом (Ф-1,6-ДФ). Инкубационная среда (конечная концентрация в М): Ф-1,6-ДФ или Г-6-Ф — 0,04, АТФ — 0,01, $MgCl_2$ — 0,01, KF — 0,2, никотинамид — 0,4, НАД — 0,003, 10% гомогенат в 0,15 М KCl — 0,2 мл, KH_2PO_4 — 0,02; pH 7,6; $KHCO_3$ — 0,5; объем пробы 3 мл.

Соотношение концентрации НАД и НАД·Н рассчитывали методом [12]. В гомогенатах легких определяли активность гексокиназы (КФ 2.7.1.1.) по [13], пируваткиназы (КФ 2.7.1.40.) в модификации [14], альдолазы Ф-1,6-ДФ (КФ 4.1.2.13.) по [15], лактатдегидрогеназы — ЛДГ (КФ 1.1.1.27.) по [16], НАД-зависимой малатдегидрогеназы — МДГ (КФ 1.1.1.37) в модификации [17], сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1.) по [18], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — Г-6-ФДГ (КФ 1.1.2.49.) по [19], липазы (КФ 3.1.1.3.) методом потенциометрического титрования с использованием в качестве субстрата трибутирина, 5-окситриптофандекарбоксилазы (КФ 4.1.1.28.) по [20]. Активность ферментов выражали в наномолях субстрата в расчете за 1 мин на 1 мг белка ткани. Содержание белка определяли по Лоури [21].

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что под влиянием гипоксического стресса в легких происходит выраженная перестройка метаболизма. Наибольшие изменения отмечены в отношении изучавшихся показателей углеводного обмена (табл. 1 и 2). Накопление в легочной ткани лактата, увеличение соотношения концентрации лактат/пируват и снижение содержания гликогена свидетельствуют об активировании при гипоксии основного пути обмена углеводов в легких — гликолитического. Это согласуется с возрастанием скорости гликолиза в гомогенатах «гипоксических» легких при использовании в качестве субстрата Г-6-Ф или в большей степени Ф-1,6-ДФ. Аналогичная направленность в изменении углеводного обмена при кислородной недостаточности отмечена и в других тканях [22—24].

Из табл. 2 видно, что активность ферментов углеводного обмена изменялась в легких «гипоксических» крыс неодинаково. Активность гексокиназы снижалась в среднем на 34%, что согласуется с данными об угнетении при острой гипоксии реакции первичного фосфорилирования глюкозы в легких (см. табл. 1) и возрастании уровня гликемии с $90,0 \pm 7,4$ до $145,4 \pm 11,8$ мг % ($P < 0,01$).

В условиях гипоксии происходило активирование альдолазы в среднем на 57,1%. Активность ЛДГ и, как показано нами ранее [27], спектр ее изоферментов, а также активность Г-6-ФДГ не изменялись, тогда как активность одного из ключевых ферментов гликолиза — пируваткиназы — увеличилась до 139%.

Ранее нами [28] отмечено, что гипобарические условия существенно не влияли на общую активность легочной НАД-зависимой МДГ, измеренной

Таблица 1

Некоторые показатели углеводного, липидного и азотистого обмена в легких крыс при нормоксии и гипоксии

Показатели	Нормоксия		Гипоксия	
	число крыс	$M \pm m$	число крыс	$M \pm m$
Глюкоза	9	22,0±0,06	10	64,0±0,52*
Гликоген	9	67,1±1,4	5	12,0±1,2*
Лактат	9	14,5±1,2	8	31,7±3,3*
Пируват	9	1,41±0,19	8	1,65±0,27
Лактат/пируват	9	12,3±2,5	8	22,9±4,9*
НАД/НАД·Н	9	1040±76,9	8	544±81,6*
Фосфолипиды	16	2227,5±142,5	9	2753,1±340,0
Триглицериды	10	44,7±7,8	10	39,3±7,7
НЭЖК	12	87,3±5,4	5	133,2±16,6*
Холестерин	8	210,8±21,4	5	244,5±54,3
Остаточный азот	13	179,0±13,2	10	290,0±4,0*
Мочевина	12	69,2±10,0	10	92,7±20,0
Креатин	9	6,90±0,36	8	12,5±1,8*
Креатинин	11	4,24±0,22	9	5,74±0,78*
Гликолиз, мкмоль лактата на 1 г ткани за 1 ч:				
с Г-6-Ф	14	3,40±0,27	7	4,62±0,42*
с Ф-1,6-ДФ	10	5,88±0,40	8	10,04±0,26*
Окисление и фосфорилирование:				
ΔО, мккатом на 1 мг сухого вещества	5	0,217±0,017	5	0,436±0,071*
ΔР, мккатом на 1 мг сухого вещества	5	0,690±0,057	5	0,959±0,070*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — $P < 0,05$ по сравнению с контролем. Концентрация НЭЖК дана в пересчете на пальмитат, триглицеридов — в пересчете на трибутирин, соотношение концентрации НАД/НАД·Н по расчетным данным.

в направлении оксалоацетат — малат, но приводили к изменению процентного распределения ее изоферментов в сторону увеличения активности митохондриальной формы (с 22,3 до 37,5%), что способствует «обращению» завершающих реакций цикла трикарбоновых кислот и является, по-видимому, приспособительным механизмом. Проведенные исследования показали (см. табл. 2), что при гипоксии отношение удельной активности цитоплазматической МДГ (МДГ_{цит}) и активности ЛДГ (МДГ_{цит}/ЛДГ) снижалось в 1^{1/2} раза. Это указывает на повышение способности ЛДГ конкурировать за цитоплазматический НАД·Н, что в определенной мере объясняет высокий уровень лактата в легких при гипоксии.

Таблица 2

Активность ферментов (в нмоль за 1 мин на 1 мг белка) в легких крыс при нормоксии и гипоксии

Фермент	Нормоксия		Гипоксия	
	число крыс	$M \pm m$	число крыс	$M \pm m$
Гексокиназа	8	64,2±4,1	8	42,1±3,0*
Альдолаза, ед.	9	70,2±8,7	12	110,6±9,6*
Пируваткиназа	9	477±49,1	8	663±60,1*
ЛДГ	8	700±60,4	8	810±91,5
МДГ	11	532±51,5	11	501±42,1
МДГ _{цит} /ЛДГ	8	0,58±0,04		0,38±0,02*
Сукцинатдегидрогеназа	8	3,22±0,12	8	5,90±0,47*
Г-6-ФДГ	11	76,3±5,1	9	73,5±7,3
Липаза, ед.	13	29,5±4,7	9	27,6±3,4
5-Окситриптофан-декарбоксилаза	16	0,51±0,03	16	0,60±0,03*

Примечание. Активность липазы рассчитана в миллиграмм-эквивалентах NaOH за 1 ч на 1 г ткани, активность альдолазы — в Е за 1 мин на 1 г белка.

Представленные данные свидетельствуют о том, что анаэробное расщепление углеводов в легких усиливается при остром дефиците кислорода не путем окисления

свободной глюкозы или использования глюкозных остатков гликогена, концентрация которого крайне низка, а в основном за счет окисления метаболитов «ниже» гексозофосфатного уровня. Увеличение образования АТФ в этом процессе рассматривается как один из существенных механизмов адаптационного процесса при гипоксии [22, 24].

Компенсаторной реакцией следует считать обнаруженное нами усиление потенциальной способности срезов легких к окислению при гипоксии флавосубстрата сукцината (см. табл. 1), не зависящее от дефицитной в этих условиях окисленной формы НАД [29]. Интенсивность поглощения неорганического фосфата при окислении сукцината также возрастала, но в меньшей степени, поэтому коэффициент окислительного фосфорилирования (Р/О) снижался в среднем с 3,18 до 2,19, приближаясь к величине, характеризующей окисление сукцината. Это согласуется с увеличением (на 83,2 %) активности сукцинатдегидрогеназы при гипоксии (см. табл. 2).

Опыты показали, что обмен липидов оказался устойчивым к действию непродолжительной гипоксии: в легких достоверно увеличивалась лишь концентрация НЭЖК, тогда как количество фосфолипидов, триглицеридов (см. табл. 1), а также активность липазы (см. табл. 2) существенно не изменились.

В легких «гипоксических» крыс увеличивалась концентрация остаточного азота (в среднем на 61 %), креатина (на 80 %), креатинина (на 34 %) и появлялась тенденция к возрастанию содержания мочевины. Все это указывает на усиление катаболизма белков и аминокислот, происходящего и в других тканях в аналогичных условиях [22, 23]. Об этом же свидетельствует и увеличение активности в легких 5-окситриптофандекарбоксилазы (см. табл. 2), что приводит к усиленному образованию серотонина и, вероятно, других биогенных аминов, поскольку упомянутый фермент обладает широкой субстратной специфичностью и декарбоксилирует, помимо 5-окситриптофана, гистидин и ДОФА [30]. Накоплению аминов в легочной ткани может способствовать снижение скорости их инактивирования в гипоксических условиях [31].

Многие из обнаруженных метаболических изменений в легких при действии острой гипоксии (увеличение концентрации глюкозы, лактата, остаточного азота, торможение активности гексокиназы) являются аналогичными тем изменениям, которые возникают при введении в организм глюкокортикоидов. Можно полагать, что усиление секреции последних на начальном этапе действия гипоксии [22, 23] является одной из основных причин, обуславливающих характер метаболической перестройки в легочной ткани, обладающей высокой способностью поглощать стероидные гормоны [3]. Усиление гликолитического пути и катаболизма белков наряду с использованием запасов макроэргических соединений является важным фактором, обеспечивающим энергетические потребности легких при действии на организм гипоксического фактора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нейнemann Н. О. — Fed. Proc., 1973, v. 32, p. 1955. — 2. Сыромятникова Н. В. — В кн.: Биохимические исследования при патологии легких. Л., 1974, с. 94. — 3. Реповауг Н. D. — Med. Mschr., 1976, Bd 30, S. 1. — 4. Roades R. A., Shay M. E., Eskew M. Z. — Am. J. Physiol., 1975, v. 229, p. 1476. — 5. Тарпоку К., Nagy S. — Clin. chim. Acta, 1963, v. 8, p. 627. — 6. Ваккер S. B., Summer son W. H. — J. biol. Chem., 1941, v. 138, p. 533. — 7. Покровский А. А. (Ред.) Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969. — 8. Tixier M., Claude J. — Ann. Biol. clin., 1974, v. 32, p. 53. — 9. Torjescu V. — Med. interna (Buc.), 1969, v. 21, p. 741. — 10. Fantini E., Orni gotti L. — Quad. Sclavo diagn. clin., 1974, v. 10, p. 429. — 11. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1962. — 12. Williamson D. H., Lund P., Krebs H. A. — Biochem. J., 1970, v. 103, p. 514. — 13. Long C. — Ibid., 1951, v. 49, p. 34. — 14. Кожевникова К. А., Ильин В. С. — Пробл. эндокринолог., 1975, № 2, с. 73. — 15. Товарницкий В. И., Волуйская Е. Н. — Лабор. дело, 1955, № 6,

с. 7. — 16. Рубина Х. М., Романчук Л. А. — *Вопр. мед. химии*, 1967, № 5, с. 503. — 17. Усатенко М. С., Цончева А. В. — Там же, 1974, № 4, с. 401. — 18. Покровский А. А., Арчаков А. И. — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., 1968, ч. 2, с. 41. — 19. Kohnberg A. A., Hogesker R. L. — *Meth. Enzymol.*, 1955, v. 1, p. 323. — 20. Ермолаев М. В., Хованская Т. П. — *Лабор. дело*, 1972, № 3, с. 150. — 21. Lowry O. H. — *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265. — 22. Барбашова З. И. Акклиматизация к гипоксии и ее физиологические механизмы. М. — Л., 1960, с. 52. — 23. Вав Лир Э., Стикней К. Гипоксия. М., 1967, с. 247, 267. — 24. Меерсон Ф. З. Общий механизм адаптации и профилактики. М., 1973, с. 91. — Палладин А. В., Хайкина Б. И., Полякова Н. М. и др. — В кн.: *Кислородная терапия и кислородная недостаточность*. Киев, 1952, с. 7. — 26. Поступаев В. В. — *Вопр. мед. химии*, 1963, № 3, с. 380. — 27. Поступаев В. В., Ананьева Г. В., Литонян З. М. — Там же, 1976, № 1, с. 59. — 28. Ананьева Г. В., Литонян З. М., Поступаев В. В. — Там же, 1977, № 2, с. 199. — 29. Кодрашова М. Н. — В кн.: *Митохондрии. Молекулярные механизмы ферментативных реакций*. М., 1972, с. 151. — 30. Горкин В. З. — *Вопр. мед. химии*, 1974, № 3, с. 227. — 31. Vakhle Y. S. — *Agents a. Action*, 1976, v. 6, p. 505.

Поступила 20/IX 1977 г.

ON THE EFFECT OF ACUTE HYPOXIA ON METABOLIC ACTIVITY OF PULMONARY TISSUE

A. G. Alexandrovich, G. V. Anan'eva, A. I. Dimitrova, A. A. Konstantinov, Z. M. Litonyan, V. V. Postupaeu, N. A. Stepanenko, T. A. Fruentova, E. G. Schetinina

Chair of Biochemistry, Medical School, Khabarovsk

Metabolic activity of rat lungs was studied in normal state and in acute hypoxia, caused by an effect of rarefied atmosphere (3 hrs, «height» 10,000 m). Glycolytic splitting of carbohydrates and catabolism of proteins were increased in lungs under hypoxic stress. In hypoxia activities of adlbase, pyruvate kinase, succinate dehydrogenase, 5-hydroxytryptophan decarboxylase were increased, but hexokinase activity was decreased. Activities of lipase, lactate dehydrogenase and NAD-dependent malate dehydrogenase were not altered, whereas the ratio in specific activity of cytoplasmic malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase was decreased.

УДК 615.322:582.7151.015.42:612.82.018:612.452

А. С. Саратиков, Т. Ф. Марина, Л. Л. Фисанова

О МЕХАНИЗМЕ ВЛИЯНИЯ САЛИДРОЗИДА НА ОБМЕН КАТЕХОЛАМИНОВ МОЗГА

Кафедра фармакологии Томского медицинского института

Под влиянием гликозида золотого корня салидрозид уменьшаются в мозге мышей содержание норадреналина (НА) и дофамина (ДА), при этом не снижается проницаемость гематоэнцефалического барьера для диоксифенилаланина; препарат тормозит активность катехол-О-метилтрансферазы и моноаминоксидазы. В опытах на кроликах под влиянием препарата изменяется уровень НА и ДА в новой коре, хвостом ядре и лимбической системе.

Препараты золотого корня (*Rhodiola rosea*, сем. Crassulaceae) в зависимости от дозы проявляют активизирующее или успокаивающее влияние на спонтанную биоэлектрическую активность и электровозбудимость отдельных структур мозга кроликов [1, 2], у больных с астеническим синдромом улучшают внимание и наряду с психостимулирующим эффектом обнаруживают седативное и антидепрессивное действие [3, 4]. Ценным свойством препаратов родиолы является их способность повышать устойчивость организма к действию стрессорных факторов различной природы [5]. Учитывая важную роль адренергических процессов центральной нервной системы в эффектах многих нейротропных средств, мы исследовали влияние основного действующего вещества родиолы салидрозид — *n*-оксифенил- β - β D-глюкопиранозил этанола на содержание катехоламинов в целом мозге мышей и в отдельных структурах мозга кроликов.

Методика

Опыты поставлены на 248 беспородных белых мышах массой 18—25 г и на 19 кроликах массой 1,8—2,2 кг. Катехоламины (КА) и диоксифенилаланин (ДОФА) определяли спектрофлуориметрически в головном мозге (без мозжечка) мышей (для анализа брали объединенную пробу от 2 животных) [6] и в 7 структурах мозга кроликов (указаны в табл. 4) [7], выделяемых при 0°C и немедленно замораживаемых. Об интенсивности «кругооборота» норадреналина (НА) судили по методу [8]. В опытах *in vivo* на мышах определяли параллельно активность моноаминоксидазы (МАО) и катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ), используя в качестве субстратов соответственно триптамин и изопропилнорадреналин (изадрин) [9]. Эксперименты с регистрацией резерпинового птоза выполнены на мышах с использованием общепринятой методики [10]. Салидрозид в дозах 30 и 100 мг/кг подкожно и новогаленовый препарат родозин, содержащий салидрозид и его агликон *l*-тирозол [11], по 0,2 и 1 мл/кг внутривенно вводили соответственно мышам и кроликам за 30 мин до декапитации. Идентичность действия указанных препаратов установлена экспериментально [12, 13]. L-ДОФА (50 мг/кг) и дисульфирам (300 мг/кг) внутривенно, ниаламид (100 мг/кг) подкожно инъекцировали мышам соответственно за 1, 3 и 20 ч до декапитации животных.

Результаты и обсуждение

В мозге интактных мышей через 30 мин после инъекции салидрозид, не изменяя уровень адреналина и ДОФА, при дозе 30 мг/кг вызывал уменьшение содержания НА на 26 %, при дозе 100 мг/кг — уменьшение концентрации НА и дофамина (ДА) на 20 и 28 % соответственно (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Влияние салидрозид на содержание КА и ДОФА (в мкг/г) в мозге мышей ($M \pm m$ из 8—12 определений)

Препарат	Доза, мг/кг	Адреналин	НА	ДА	ДОФА
Контроль		0,033±0,0029	0,50±0,0198	4,06±0,221	0,037±0,0024
Салидрозид	30	0,037±0,0020	0,37±0,0142	3,95±0,053	0,039±0,0040
P_{1-2}		0,289	<0,001	0,624	0,695
Салидрозид	100	0,030±0,0020	0,40±0,0410	2,93±0,021	0,044±0,0030
P_{1-3}		0,379	0,042	0,001	0,073
Ниаламид	100	0,049±0,0026	0,97±0,0581	5,30±0,114	0,045±0,0036
P_{1-4}		0,001	<0,001	<0,001	0,078
Ниаламид + + салидрозид	100+30	0,048±0,0038	0,94±0,030	5,36±0,149	0,041±0,0012
P_{4-5}		0,844	0,695	0,769	0,334
ДОФА	50				0,74±0,039
P_{1-6}					<0,001
Салидрозид + + ДОФА	30+50				0,95±0,057
P_{6-7}					0,011

Понижение уровня НА и ДА в мозге может быть обусловлено снижением проницаемости гематоэнцефалического барьера для их предшественника в биологическом синтезе — ДОФА, торможением скорости синтеза и активацией разрушения медиаторов, воздействием на процессы их депонирования и обратного транспорта.

Эксперименты с введением мышам L-ДОФА показали, что салидрозид (30 мг/кг) способствует увеличению в мозге животных прироста экзогенного ДОФА на 26 % по сравнению с таковым у контрольных животных, получавших воду и L-ДОФА (см. табл. 1). Эти данные свидетельствуют о повышении под влиянием препарата проницаемости гематоэнцефалического барьера для предшественника КА. Под действием салидрозид незначительно (на 16,8 %) понижалась активность МАО и существенно (на 63 %) тормозилась активность КОМТ (табл. 2), при этом замедлялась инактивация КА путем O-метилирования и окислительного дезаминирования.

О влиянии салидрозид на интенсивность «кругооборота» НА судили по степени изменения содержания этого амина в мозге на фоне либо блокады синтеза НА с помощью ингибитора дофамин-β-гидроксилазы дисульфирама, либо блокады ингибитором MAO ниаламидом внутринейро-

Т а б л и ц а 2

Влияние салидрозид (30 мг/кг) на активность КОМТ и MAO ($M \pm m$ из 10 определений)

Препарат	Период полураспада, мин	
	изадрина	триптамина
Контроль	9,85±0,291	11,22±0,280
Салидрозид	16,07±1,98	13,11±0,490
<i>P</i>	0,007	0,003

Салидрозид не влиял на прирост НА, вызванный введением ниаламида, что свидетельствует об отсутствии действия препарата на синтез медиатора. В мозге животных после введения дисульфирама содержание НА снижалось с 0,46±0,0198 до 0,23±0,0221 мкг/г ($P=0,001$). Салидрозид (30 мг/кг) проявил тенденцию к нормализации этого показателя — под его влиянием уровень НА в мозге повысился на 47,8% ($P=0,09$). Поскольку в условиях блокады синтеза

НА степень истощения его ресурсов в мозге отражает интенсивность потребления медиатора [15], увеличение под влиянием салидрозид концентрации эндогенного НА свидетельствует об уменьшении его потребления. Возможно, это связано с замедлением биотрансформации НА вследствие понижения активности КОМТ и MAO.

Т а б л и ц а 3

Влияние салидрозид (30 мг/кг) на интенсивность резернинового птоза у мышей ($M \pm m$ из 6 определений)

Препарат	Интенсивность птоза в баллах через			
	3 ч	4 ч	5 ч	6 ч
А. Салидрозид введен за 30 мин до рауседила				
Контроль	2,0±0,26	2,25±0,09	2,75±0,26	3,17±0,26
Салидрозид	1,25±0,26	1,33±0,44	2,25±0,35	2,25±0,44
<i>P</i>	0,06	0,07	0,06	0,34
Б. Салидрозид введен через 3 ч после рауседила				
Контроль	1,08±0,44	2,00±0,62	2,33±0,53	2,58±0,53
Салидрозид	0,75±0,44	1,33±0,62	1,83±0,62	1,92±0,62
<i>P</i>	0,63	0,50	0,56	0,44

Пр и м е ч а н и е. Резерпин вводили подкожно в виде препарата «рауседил» в дозе 1 мг/кг.

Таким образом, под действием салидрозид не снижается проницаемость гематоэнцефалического барьера для предшественника КА и не изменяется скорость синтеза НА, несколько уменьшая интенсивность его потребления. Торможение под влиянием препарата активности MAO и КОМТ не сопровождается накоплением избытка медиаторов. Напротив, в мозге интактных животных обнаруживается понижение уровня НА и ДА, что, по-видимому, связано с воздействием препарата на процессы депонирования и обратного захвата аминов. Это предположение подтверждается результатами опытов с ниаламидом и резерпином (табл. 1 и 3). Салидрозид не изменял уровень КА в мозге на фоне предшествующего введения ниаламида. Последний, как известно, вызывает увеличение в мозге содержания свободных функционально активных форм моноаминов благодаря нарушению инактивации их и более интенсивному освобождению из депо или вслед-

ствие блокады активного транспортного механизма пресинаптических мембран [16, 17]. В экспериментах с регистрацией резерпинного птоза антагонизм салидрозид с истощителем моноаминовых депо выявлялся лишь при условии предшествующего резерпину введения салидрозид. Следовательно, для проявления эффекта салидрозид на содержание НА и ДА в мозге необходима интактность транспортных механизмов, чувствительных к резерпину и ниламиду.

В опытах на кроликах родозин, содержащий салидрозид и его агликон, вызывал несоднотипные сдвиги концентрации КА и ДОФА в различных структурах мозга (табл. 4). При дозе препарата 0,2 мл/кг, проявляющей активирующее влияние на спонтанную биоэлектрическую активность мозга животных [1, 2], отмечено увеличение концентрации ДОФА и ДА в новой коре и понижение уровня НА в хвостатом ядре; выявлена тенденция к накоплению в гиппокампе ДОФА и НА с одновременным уменьшением в этой структуре содержания ДА. В дозе 1 мл/кг, оказывающей синхронизирующее влияние на ЭЭГ, родозин приводил к понижению уровня ДА в хвостатом ядре; отмечена тенденция к накоплению НА в миндалине; в гиппокампе при этом сохранялся сдвиг в сторону увеличения концентрации НА и снижения содержания ДА.

Известно, что НА является медиатором «эрготрофной» системы мозга [18], участвующим в формировании реакции внимания и настроения [19], значительными повышающим кроссреляционные связи между образованиями неокортекса и лимбико-дизэнцефального комплекса [20]. Дефицит НА в

Таблица 4

Влияние родозина на содержание катехоламинов и ДОФА (в мкг/г) в структурах мозга кроликов (M ± m из 5—7 определений)

Область мозга	Адреналин			НА			ДА			ДОФА		
	контроль	0,2 мл/кг	1 мл/кг									
Двигательная кора	0,05 ± 0,008	0,06 ± 0,015 0,845	0,06 ± 0,007 0,290	0,41 ± 0,033	0,38 ± 0,062 0,698	0,36 ± 0,042 0,311	0,44 ± 0,037	0,61 ± 0,057 0,052	0,40 ± 0,045 0,496	0,06 ± 0,006	0,10 ± 0,014 0,017	0,06 ± 0,0203 1,0
Хвостатое ядро	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,014 0,100	0,18 ± 0,024 0,134	0,87 ± 0,06	0,60 ± 0,079 0,027	0,82 ± 0,088 0,629	1,80 ± 0,074	1,45 ± 0,257 0,223	1,04 ± 0,115 0,001	0,20 ± 0,017	0,22 ± 0,003 0,442	0,20 ± 0,03 1,0
Гиппокамп	0,07 ± 0,008	0,09 ± 0,008 0,666	0,08 ± 0,006 0,591	0,39 ± 0,032	0,50 ± 0,040 0,069	0,58 ± 0,074 0,050	0,75 ± 0,074	0,56 ± 0,053 0,065	0,47 ± 0,08 0,034	0,07 ± 0,008	0,10 ± 0,013 0,071	0,077 ± 0,005 1,0
Миндаловидный комплекс	0,17 ± 0,021	0,21 ± 0,037 0,343	0,27 ± 0,049 0,099	0,94 ± 0,060	1,14 ± 0,135 0,563	1,28 ± 0,151 0,058	1,69 ± 0,309	1,50 ± 0,130 0,562	1,21 ± 0,181 0,218	0,24 ± 0,026	0,29 ± 0,041 0,253	0,23 ± 0,028 1,0
Гипоталамус	0,19 ± 0,026	0,21 ± 0,03	0,25 ± 0,035	1,63 ± 0,162	1,60 ± 0,127 0,922	1,86 ± 0,163 0,559	1,62 ± 0,187	1,73 ± 0,360 0,770	1,53 ± 0,107 0,696	0,28 ± 0,015	0,30 ± 0,041 0,627	0,26 ± 0,030 0,561
Средний мозг	0,05 ± 0,005	0,05 ± 0,014 0,698	0,05 ± 0,006 0,441	0,38 ± 0,026	0,34 ± 0,035 0,387	0,38 ± 0,029 1,0	0,37 ± 0,047	0,42 ± 0,074 0,627	0,33 ± 0,038 0,559	0,06 ± 0,004	0,08 ± 0,007 0,165	0,06 ± 0,008 1,0
Средний и задний мозг	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,006 0,165	0,03 ± 0,003 0,115	0,31 ± 0,047	0,30 ± 0,025 0,845	0,30 ± 0,022 0,844	0,27 ± 0,037	0,41 ± 0,072 0,117	0,20 ± 0,026 0,158	0,04 ± 0,004	0,04 ± 0,006 0,562	0,03 ± 0,002 0,136

мозге сопутствует развитию депрессивных состояний [21]. Можно полагать, что с накоплением НА в гиппокампе и миндалинах — структурах лимбической системы мозга, играющей важную роль в регуляции аффективно-эмоционального состояния организма, — связаны психостимулирующий и антидепрессивный эффекты препаратов золотого корня.

Базальные ганглии, к системе которых относится хвостатое ядро, осуществляют тормозной контроль над двигательными и поведенческими реакциями у высших животных и человека [22]. Функция этой структуры мозга тесно связана с ДА, выполняющим в ней роль медиатора [23]. Тормозя нейроны хвостатого ядра, ДА устраняет тормозные влияния, идущие от этой структуры к новой коре. По-видимому, понижение уровня ДА в хвостатом ядре, наблюдаемое под действием большой дозы родозина, проявляется усилением тормозных влияний этой структуры на кору больших полушарий и имеет отношение к его свойству усиливать процессы внутреннего торможения и вызывать синхронизацию спонтанной биоэлектрической активности мозга [1, 2].

Таким образом, действие салидрозида на адрено- и дофаминергические процессы головного мозга, обуславливающее некоторые нейротропные эффекты препарата, неравнозначно в зависимости от дозы, исходного уровня КА и характера мозговой структуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Марина Т. Ф., Алексеева Л. П., Плотникова Т. М. — Изв. Сибирск. отд. АН СССР, Сер. биол., 1973, вып. 3, № 15, с. 85—90. — 2. Марина Т. Ф., Плотникова Т. М. — В кн.: Научная конференция физиологов, биохимиков и фармакологов Западно-Сибирского объединения. 5-я. Сборник материалов. Томск, 1973, с. 258—259. — 3. Михайлова М. Н. — В кн.: Вопросы реабилитации больных первично-психическими заболеваниями. Томск, 1975, с. 198—199. — 4. Мещерякова Э. И., Михайлова М. Н., Лбрамейцев В. Д. — Там же, с. 180—182. — 5. Саратиков А. С. Золотой корень (Родиола розовая). Томск, 1974. — 6. Матлина Э. Ш., Рахманова Т. Б. — В кн.: Методы исследования некоторых систем гуморальной регуляции. 4., 1967, с. 136—143. — 7. Матлина Э. Ш., Щедрина Р. Н., Ширинян Э. Л. — Труды по новой аппаратуре и методикам, 1969, вып. 8, с. 98—104. — 8. Würtman R. J., Zigmond M. J. — *Anesthesiology*, 1968, v. 109, p. 714—725. — 9. Кулинский В. И., Шмутер Г. М. — *Вопр. мед. химии*, 1971, № 1, с. 103—109. — 10. Rubin B., Malone M. H., Waugh M. H. et al. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1957, v. 120, p. 125—136. — 11. Саратиков А. С., Краснов Е. А., Хныкина Л. А. и др. — Изв. Сибирск. отд. АН СССР, Сер. биол., 1967, вып. 1, № 5, с. 54—60. — 12. Аксенова Р. А., Зотова М. И., Нехода М. Ф. и др. — В кн.: Стимуляторы центральной нервной системы. Томск, 1968, вып. 2, с. 3—12. — 13. Марина Т. Ф., Алексеева Л. П. — Там же, с. 22—26. — 14. Costa E., Neff N. H. — In: *Biochemistry and Pharmacology of the Basal Ganglia*. New York, 1966, p. 29—33. — 15. Бару А. М., Рацин М. С. — *Бюлл. exper. биол.*, 1973, № 8, с. 34—37. — 16. Gresn H., Suwuegy L. — *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1962, v. 135, p. 426—441. — 17. Vesson S., Paucndah R. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1969, v. 7, p. 1678—1679. — 18. Brodie V. B., Shore P. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, v. 66, p. 631—642. — 19. Fuxe K., Hökfelt T., Ungerstedt U. — *Int. Rev. Neurobiol.*, 1970, v. 13, p. 93—126. — 20. Каркищенко Н. Н. Фармакология системной деятельности мозга. Ростов н/Д., 1975. — 21. Praag H. M., Korff J. — *Pharmacopsychiat.* — *Neuropsychopharmacol.*, 1975, Bd 8, S. 322—326. — 22. Лрушаниян Э. Б., Белозерцев Ю. А. — *Ж. высш. нервн. деят.*, 1974, № 1, с. 55—63. — 23. Nogonkiewicz O. — *Brit. med. Bull.*, 1973, v. 29, p. 171—178.

Поступила 12/IX 1977 г.

ON THE EFFECT OF SALIDRASID ON TURNOVER OF [CATECHOLAMINES IN BRAIN

A. S. Saratikov, T. F. Marina, L. L. Firsanova

Chair of Pharmacology, Medical School, Tomsk

Salidrasid (glycoside of golden root) decreased the content of noradrenaline and dopamine in mice brain, without decreasing the permeability of the blood-brain barrier for dihydroxyphenylamine. The glycoside inhibited catechol-O-methyl transferase and monoamine oxidase activities. The preparation of salidrasid also altered the content of noradrenaline and dopamine in rabbit new cerebral neocortex, nucleus caudatus and limbic system.

М. М. Киреев, В. Д. Конвай

НУКЛЕОТИДНЫЙ ФОНД ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ УМИРАНИЯ ОРГАНИЗМА

Центральная научно-исследовательская лаборатория Омского медицинского института

Исследовали содержание кислотоэкстрагируемой фракции нуклеотидов в головном мозге крыс через 5 и 30 мин от начала умирания организма, вызванного острой кровопотерей. Через 5 мин опыта уровень АТФ, ГТФ и УТФ, АДФ, ГДФ и УДФ, а также НАД резко понизился; количество АМФ, ГМФ, ИМФ, ЦМФ, нуклеозидов и азотистых оснований значительно повысилось. Через 30 мин от начала опыта возросло содержание ЦМФ, нуклеозидов и азотистых оснований, а уровень остальных исследуемых показателей снизился по сравнению с предыдущим сроком исследования. Обсуждается возможное влияние найденных изменений на процесс оживления организма.

Благоприятный исход оживления организма в значительной мере зависит от состояния энергетических ресурсов мозга. Известно, что при прекращении кровотока первыми повреждаются нервные клетки вследствие резкого преобладания в них аэробных окислительных процессов [1]. В этих условиях процессы гликолиза не способны компенсировать сдвиги, вызванные прекращением поступления кислорода в ткани, и в мозге снижается уровень АТФ [2], что в свою очередь может привести к дезорганизации других звеньев обмена веществ, в частности к нарушению баланса кислотоэкстрагируемых нуклеотидов. Поскольку эти соединения играют важную роль в процессах аккумуляции энергии, переносе субстратов, регуляции клеточного деления и являются предшественниками в синтезе нуклеиновых кислот [3], нарушение их нормального соотношения в клетке может оказать крайне неблагоприятное воздействие при последующем оживлении организма.

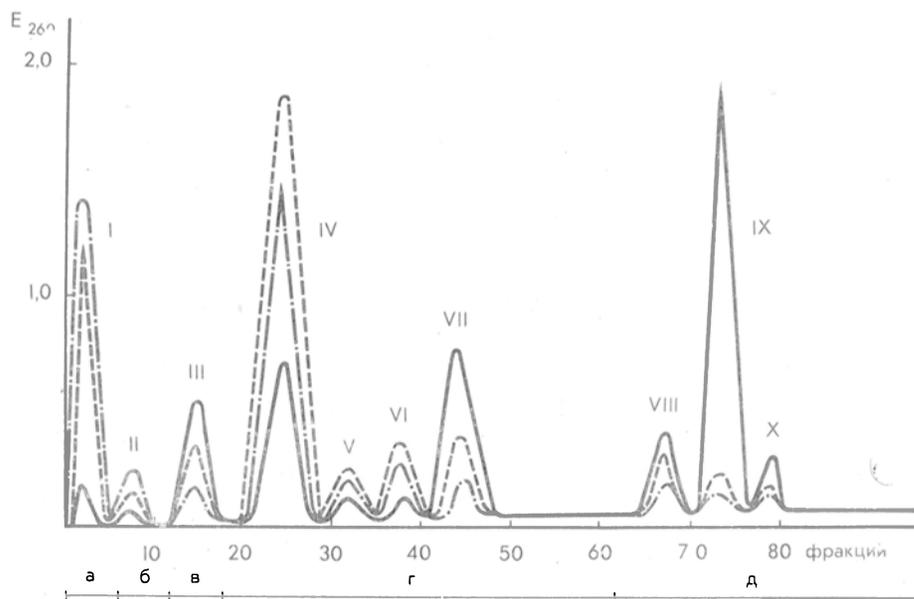
Целью данной работы явилось выяснение характера изменений фонда кислотоэкстрагируемых нуклеотидов ткани мозга крыс через 5 и 30 мин от начала умирания организма, вызванного острой кровопотерей.

М е т о д и к а

Опыты проводили на 20 беспородных белых крысах-самцах массой около 200 г, которых после эфирного наркоза подвергли обескровливанию путем перерезки брюшной аорты. Через 5 и 30 мин после агонального вдоха ткани головного мозга фиксировали погружением голов животных в жидкий азот, извлекали и обрабатывали в замороженном состоянии, что позволило предотвратить распад макроэргических соединений во время подготовки материала [4]. В качестве контроля было использовано 10 животных, головы которых замораживали сразу же после наркоза. 1 г больших полушарий головного мозга гомогенизировали в 2 мл холодного раствора 0,6 н. хлорной кислоты и центрифугировали. Осадок повторно обрабатывали 0,2 н. хлорной кислотой. Объединенные надосадочные жидкости нейтрализовали 10% раствором КОН, выпавший перхлорат калия отделяли, а экстракт подвергали анионообменной хроматографии модифицированным [5] методом Хурльберга [6] на ионообменнике Дауэкс 1Х8 в формиатной форме. Использовали колонки размером 0,6×10 см. Собирали фракции объемом 3,5 мл, поступающие с колонки со скоростью 12 мл в час. Элюирующие растворы: а — H₂O; б — 0,02 М HCOOH; в — 0,05 М HCOOH; г — градиент H₂O — 4,0 М HCOOH; д — градиент 4,0 М HCOOH — 0,8 М формиат аммония в 4,0 М HCOOH. Оптическую плотность фракций измеряли при 260 и 280 нм на спектрофотометре СФ-16. Идентификацию нуклеотидов в отдельных пиках (см. рисунок) производили по их положению на профиле элюции [5—7], определением спектральных характеристик в кислой и щелочной средах и после бромирования [8, 9]. НАД определяли флюориметрически [10]. Содержание отдельных нуклеотидов рассчитывали на 1 г сырой ткани, используя молярные коэффициенты экстинкции [9]. Уровень нуклеозидов и азотистых оснований характеризовали количеством единиц оптической плотности при 260 нм на 1 г сырой ткани, содержание аденозина, инозина и гипоксантина рассчитывали, исходя из их спектральных характеристик и изменения содержания нуклеотидов между контролем и опытом [11]. Результаты исследования обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента [12].

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных (см. таблицу) показал, что ишемия мозга через 5 мин от начала умирания привела к снижению уровня НАД на 22%, через 30 мин — на 41%. Это снижение оказывает неблагоприятное влияние на организм, поскольку недостаток НАД тормозит процесс гликолиза [13],



Хроматографическое разделение кислотэкстрагируемых нуклеотидов головного мозга крысы на анионсменнике Дауэкс 1x8.

Сплошная линия — контроль; пунктирная — 5 мин после кровопотери; точки — 30 мин после кровопотери. I — нуклеозиды и азотистые основания; II — ЦМФ; III — НАД; IV — АМФ; V — ГМФ; VI — ИМФ; VII — АДФ; VIII — ГДФ + УДФ; IX — АТФ; X — ГТФ + УТФ. а — д — см. в разделе «Методика».

что в условиях ишемии может привести к снижению выработки АТФ анаэробным путем. Действительно, уровень АТФ через 5 мин от начала умирания понизился в 16 раз, через 30 мин — в 35 раз. Содержание АДФ на 5-й

Содержание кислотэкстрагируемых нуклеотидов (в мкмоль на 1 г сырого веса ткани) в больших полушариях головного мозга крысы

Соединение	Контроль	Время после кровопотери, мин			
		5	<i>p</i>	30	<i>p</i>
НАД	0,248±0,012	0,192±0,005	<0,001	0,146±0,004	<0,001
АМФ	0,447±0,026	1,234±0,019	<0,001	0,840±0,034	<0,001
АДФ	0,706±0,019	0,218±0,012	<0,001	0,080±0,011	<0,001
АТФ	1,417±0,023	0,086±0,003	<0,001	0,038±0,002	<0,001
ИМФ	0,127±0,021	0,328±0,017	<0,001	0,245±0,014	<0,001
ГМФ	0,045±0,008	0,249±0,011	<0,001	0,154±0,013	<0,001
ГДФ+УДФ	0,358±0,012	0,272±0,020	<0,01	0,176±0,012	<0,001
ГТФ+УТФ	0,352±0,021	0,056±0,015	<0,001	0,099±0,017	<0,001
ЦМФ	0,045±0,008	0,086±0,004	<0,05	0,172±0,012	<0,001
НиаО	2,2±0,2	11,8±0,2	<0,001	16,1±0,3	<0,001

минуте опыта снизилось более чем в 3 раза, на 30-й минуте — в 9 раз. Уровень АМФ на 5-й минуте эксперимента повысился почти в 3 раза, по всей вероятности, вследствие деградации АТФ, АДФ и НАД. При этом повысился почти в 3 раза и уровень ИМФ, что связано скорее всего с увеличением ак-

тивности АМФ-деаминазы, активируемой сдвигом внутриклеточного рН в кислую сторону [14]. На 30-й минуте опыта содержание АМФ и ИМФ превышало контрольные цифры только в 2 раза. Вероятно, вследствие резкого снижения концентраций АТФ и АДФ, являющихся ингибиторами 5'-нуклеотидазы [15], усилились процессы дефосфорилирования АМФ и ИМФ. Все это могло бы способствовать уменьшению уровня АМФ, предотвращая таким образом быстрое снижение энергетического заряда (E) ткани мозга, несколько отсрочив этим подавление активности ряда ключевых ферментов [16].

Уровень продуктов дефосфорилирования нуклеозидмонофосфатов — нуклеозидов и азотистых оснований — на 5-й минуте эксперимента увеличился на 440%, на 30-й минуте — на 640% по сравнению с контролем. Расчет, произведенный по убыли нуклеотидов и приросту суммарной оптической плотности нуклеозидов и азотистых оснований [11], показал, что содержание аденозина в мозге подопытных животных на 5-й минуте опыта увеличилось на $0,435 \pm 0,019$ мкмоль, а количество инозина и гипоксантина — на $0,452 \pm 0,023$ мкмоль на 1 г ткани по сравнению с контролем. Но на 30-й минуте эксперимента уровень аденозина превышал контрольный лишь на $0,087 \pm 0,007$ мкмоль, в то время как количество инозина и гипоксантина возросло и превысило контрольный уровень на $1,627 \pm 0,030$ мкмоль на 1 г ткани. Эти данные свидетельствуют о высокой активности аденозиндеаминазы, которая в условиях опыта могла активироваться накапливающимся в результате распада фосфорных эфиров неорганическим фосфатом. Присутствие значительных количеств аденозина, обнаруживаемого в мозге при нормальных условиях лишь в следовых количествах [17], в силу его гиппогенного действия [18] может сыграть определенную роль при последующем оживлении организма. Вазодилаторным эффектом этого соединения [19] можно было бы объяснить увеличение просвета артериол, наблюдаемое в первые минуты постреанимационного периода [20]. Кроме того, при оживлении аденозин может стать источником пуриновых нуклеотидов, превращаясь в АМФ через аденозинкиназную реакцию [19]. Катаболизм аденозина на 30-й минуте от начала умирания до инозина и гипоксантина, превращение которых в АМФ является менее выгодным процессом, может стать одним из факторов необратимости.

Изучение уридиловых и гуаниловых нуклеотидов в мозге крыс показало, что на 5-й минуте от начала умирания происходит снижение уровня ГТФ и УТФ в 7 раз, а на 30-й минуте они обнаруживаются лишь в следовых количествах. Снижение уровня ГДФ и УДФ произошло только на 30-й минуте эксперимента. Содержание ГМФ на 5-й минуте опыта превышало контрольные цифры в $5\frac{1}{2}$ раза, затем оно снизилось, по-видимому, вследствие активации процессов дефосфорилирования. Содержание ЦМФ в мозге на 5-й минуте умирания возросло в 2 раза, на 30-й минуте — в 4 раза, что указывает на распад ЦТФ и ЦДФ-производных, которые в условиях данного опыта не определялись ввиду низкого уровня их в мозге.

Сопоставляя данные, полученные в разные сроки исследования, можно заключить, что на 30-й минуте от начала умирания фонд нуклеозидтрифосфатов полностью исчерпывается, идет истощение запаса нуклеозиддифосфатов и НАД. Уровень АМФ, ИМФ и ГМФ, возросший на 5-й минуте эксперимента, также начинает снижаться. Следовательно, умирание ведет к деградации кислотоэкстрагируемых нуклеотидов до конечных продуктов — нуклеозидов и азотистых оснований. Накопление последних в тканях может при восстановлении кровотока стать одним из факторов, определяющих исход оживления. На фоне дефицита макроэргических соединений, истощения внутренних ресурсов мозга, сопровождающегося усиленным поступлением в ткани кислорода, может наступить истощение механизмов, защищающих клеточные структуры от повреждения. Низкая скорость биосинтеза нуклеозидмонофосфатов в мозге [21] и недостаток необходимых субстратов для их ресинтеза [19] из аденозина, гипоксантина и гуанина после ре-

содержание норадреналина, резко снизившись к 10-й минуте после введения, составляло уже $0,190 \pm 0,117$ мкг/л, а через 15 мин становилось даже ниже исходного уровня. Такая отрицательная фаза продолжалась еще через 30 мин после введения.

Иначе изменялась концентрация норадреналина в крови у старых животных. Снизившись в первые 2 мин, содержание норадреналина в течение всего последующего времени исследования достоверно не изменялось: через 10 мин после введения $2,939 \pm 0,208$ мкг/л, через 15 мин — $2,125 \pm 0,180$ мкг/л и через 30 мин — $2,500 \pm 0,212$ мкг/л. Это

свидетельствует о том, что у старых животных процесс элиминации введенного норадреналина в значительной мере затянута во времени.

Характер элиминации внутривенно введенного адреналина существенно отличается от характера элиминации норадреналина (рис. 2). Прежде всего следует отметить тот факт, что содержание адреналина в крови крыс обеих возрастных групп через 10 с после его введения было выше, чем уровень

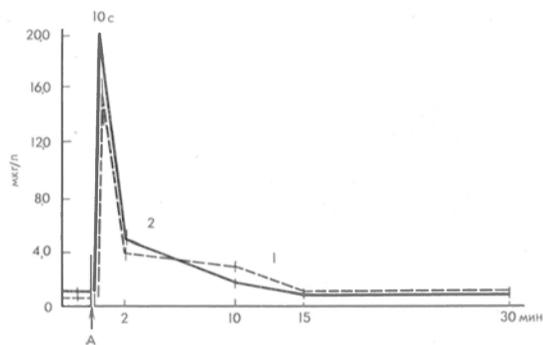


Рис. 2. Влияние внутривенного введения адреналина (А) на содержание адреналина в крови взрослых (1) и старых (2) крыс.

норадреналина после введения последнего, и составляло у взрослых животных $15,997 \pm 0,997$ мкг/л, у старых — $18,042 \pm 0,567$ мкг/л (исходное содержание адреналина в крови старых крыс несколько выше, чем у взрослых, — $0,887 \pm 0,070$ и $0,697 \pm 0,023$ мкг/л соответственно; $P < 0,05$). Уже через 2 мин после введения адреналина уровень его в крови взрослых животных снизился до $4,047 \pm 0,141$ мкг/л, старых — до $4,856 \pm 0,282$ мкг/л. В последующие промежутки времени происходило дальнейшее снижение уровня адреналина, и через 10 мин после введения он составлял в крови взрослых животных $2,952 \pm 0,200$ мкг/л, старых — $1,856 \pm 0,282$ мкг/л. Через 15 мин после введения содержание адреналина в крови взрослых и старых крыс возвращалось к исходному уровню и составляло $0,947 \pm 0,140$ и $0,714 \pm 0,052$ мкг/л соответственно. Такое же положение сохранялось и через 30 мин после введения. Содержание адреналина в крови взрослых крыс к этому времени составляло $0,986 \pm 0,159$ мкг/л, старых — $0,857 \pm 0,057$ мкг/л.

Обсуждение результатов

Определенное представление об особенностях катаболизма катехоламинов в старости можно получить, изучая скорость снижения концентрации адреналина и норадреналина в крови после введения их животным разного возраста. При проведении в этом направлении исследования выявлено, что скорость элиминации норадреналина из крови взрослых и старых крыс практически одинакова лишь в первые 2 мин после введения. В более поздние сроки наблюдались четкие возрастные различия. Если у взрослых животных концентрация норадреналина в крови продолжала неуклонно снижаться, то у старых крыс даже на 30-й минуте она оставалась на том же уровне, что и на 2-й минуте.

Одним из механизмов в сложном процессе элиминации катехоламинов из крови является связывание их тканями в неизменном виде, причем норадреналин захватывается тканями из кровотока значительно активнее адреналина [14—16]. Этот процесс происходит в области адренергических терминалей, которые обладают специальной транспортной системой обрат-

При изучении этих сдвигов выявлена разнонаправленность изменений в системе нейрогуморальной регуляции, а именно, ослабление с возрастом нервных влияний на органы и ткани и повышение их чувствительности к ряду гуморальных факторов [2—4].

Одно из важных мест в механизмах нейрогуморальной регуляции занимает симпато-адреналовая система, осуществляющая свое влияние на функции организма через гормонально-медиаторное звено — катехоламины.

При этом решающее значение в реализации влияний симпато-адреналовой системы приобретают катехоламины крови, поскольку кровь наряду с нервной системой ответственна за передачу регуляторных влияний центра на органы и ткани.

В связи с этим определенным интересом представляет изучение механизмов, ответственных за прекращение либо предотвращение физиологического действия катехоламинов, поступающих в сосудистое русло в повышенных концентрациях. Механизмы элиминации катехоламинов из кровотока отличаются чрезвычайной мощностью, которая определяется по меньшей мере двумя основными причинами. Одна из них — связывание катехоламинов тканями в неизмененном виде с последующим постепенным освобождением и разрушением моноаминоксидазой (МАО), вторая — катаболизм в тканях под влиянием катехоламин-о-метилтрансферазы (КОМТ) [5—7].

Принимая во внимание, что с возрастом наблюдаются сдвиги в содержании катехоламинов в крови [8, 9], изменяется интенсивность их метаболизма [5, 10—12], а также ослабляется процесс обратного захвата норэпинефрина адренергическими терминалями [10], представлялось целесообразным изучить элиминацию катехоламинов из крови животных разного возраста.

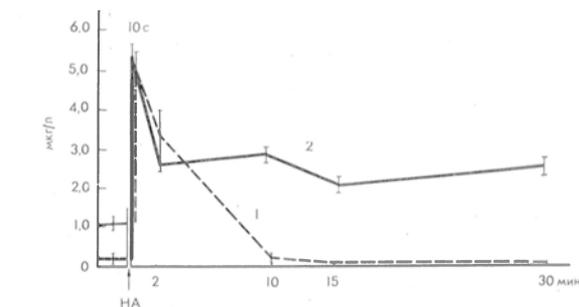


Рис. 1. Влияние внутривенного введения норэпинефрина (НА) на содержание норэпинефрина в крови взрослых (1) и старых (2) крыс.

Методика

Исследование проведено на белых крысах-самцах 2 возрастных групп: 8—10-месячных (взрослых) и 24—26-месячных (старых). Содержание катехоламинов в крови определяли флюоросцентным методом в модификации Э. П. Матлиной [13]. Исходный уровень адреналина и норэпинефрина, а также содержание катехоламинов через 10 с, 2, 10, 15, 30 мин после их внутривенного введения определяли в крови у крыс отдельных групп. В каждую из групп было включено 8 животных. Адреналин и норэпинефрин вводили из расчета 5 мкг на 100 г массы. Кровь для анализа брали из сонной артерии. Все крысы находились под уретановым наркозом.

Результаты исследования

Как показало исследование (рис. 1), исходный уровень норэпинефрина в крови взрослых крыс достоверно выше ($P < 0,001$), чем у старых, и составляет $1,111 \pm 0,111$ и $0,154 \pm 0,070$ мкг/л соответственно. Через 10 с после введения концентрация норэпинефрина в крови крыс значительно возросла и составила у взрослых животных $5,445 \pm 0,349$ мкг/л, у старых — $5,476 \pm 0,618$ мкг/л. Уже через 2 мин после введения уровень норэпинефрина в крови крыс обеих возрастных групп резко снизился. В крови взрослых крыс содержание его уменьшилось до $3,444 \pm 0,642$ мкг/л, у старых — до $2,651 \pm 0,161$ мкг/л. В последующие отрезки времени процесс элиминации норэпинефрина имел четкие возрастные особенности. В крови взрослых животных

нимации могут затруднить восстановление фонда кислотоэкстрагируемых нуклеотидов. Не исключено, что перечисленные выше сдвиги могут быть одной из причин вторичной гипоксии, развивающейся в восстановительном периоде после реанимации [22].

ЛИТЕРАТУРА

1. Шапот В. С. — Успехи совр. биол., 1952, т. 35, № 2, с. 244. — 2. Со-роковой В. И., Владимиров Ю. А. — В кн.: Биофизика. М., 1975, т. 5, с. 12. — 3. Хьюиенекенс Ф. — В кн.: Современные проблемы биохимии. М., 1961, с. 169. — 4. Воскобойников Г. В. — Биохимия, 1966, т. 31, № 5, с. 1041. — 5. Piccoli F., Samarda R., Bonavita V. — J. Neurochem., 1969, v. 16, p. 159. — 6. Hurlbert R. B., Schmitz H., Brum A. F. et al. — J. Biol. Chem., 1954, v. 209, p. 23. — 7. Головацкий И. Д., Крас-невич А. Я. — Биохимия, 1970, т. 35, № 2, с. 296. — 8. Венкстерн Т. В., Баев А. А. Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклео-тидов рибонуклеиновых кислот. М., 1967. — 8. Справочник по биохимии. Киев, 1971. — 10. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., 1965. — 11. Pull I., McIlwain H. — Biochem. J., 1972, v. 130, p. 975. — 12. Ойвин И. А. — Пат. физиол., 1960, № 4, с. 78—13. Телепнева В. И., Нсаева И. В. — Вопр. мед. химии, 1965, № 2, с. 36. — 14. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T. — FEBS Letters, 1975, v. 58, p. 245. — 15. Olsson R. A., Gentry M. K., Townsend R. S. — In: Current Topics in Coronary Research. Eds. C. Bloor., R. Olsson. New York, 1973, p. 23. — 16. Charman A. G., Atkinson D. E. — J. Biol. Chem., 1973, v. 248, p. 8309. — 17. Kleihues P., Kobayashi K., Hossmann K. A. — J. Neurochem., 1974, v. 23, p. 417. — 18. Haulica I., Ababei L., Branisteanu D. et al. — Ibid., 1973, v. 21, p. 1019. — 19. Верне Р. М., Рубио Р., Сурниш Р. Р. — Circulat. Res., 1974, v. 35, p. 262. — 20. Евсеенко Н. Л., Корпачев В. Г. — В кн.: Патогенез и экспериментальная терапия терминальных состояний. Омск, 1976, с. 9. — 21. Howard W. J., Kerson L. A., Appel S. H. — J. Neurochem., 1970, v. 17, p. 121. — 22. Корпачев В. Г., Долгих В. Т., Семченко В. В. и др. — В кн.: Клиническая патофизиология терминальных состояний. М., 1973, с. 44.

Поступила 30/IX 1977 г.

NUCLEOTIDE POOL IN RAT BRAIN OF DYING ANIMALS

M. M. Kireev, V. D. Konvi

Central Research Laboratory, Medical School, Omsk

Composition of acid-extractable fraction of nucleotides was studied in brain of dying rats after acute hemorrhage. Within the first 5 min content of ATP, GTP, UTP, GDP, UDP and NAD was distinctly decreased; content of AMP, GMP, IMP, CMP, nucleosides and nitrogen bases was markedly increased. Within the following 30 min of the dying process concentration of CMP and nitrogen bases was increased but content of the other substances studied was decreased as compared with the previous experimental period. Possible effect of the alterations found on reanimation of an organism is discussed.

УДК 615.357.452.033-053

Г. С. Воронков

ОСОБЕННОСТИ ЭЛИМИНАЦИИ АДРЕНАЛИНА И НОРАДРЕНАЛИНА ИЗ КРОВИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Лаборатория биохимии Института геронтологии АМН СССР, Киев

В опытах на белых крысах разного возраста изучали особенности элиминации из крови катехоламинов после их внутривенного введения. Показано, что в то время как элиминация адреналина из крови взрослых и старых крыс имеет одинаковый характер, в элиминации норадреналина наблюдаются четкие возрастные различия.

Для понимания механизмов старения организма особое значение имеет изучение особенностей сдвигов в системе нейрогуморальной регуляции, которая, приводя в соответствие функциональное состояние органов и тканей с требованиями внешней среды, обеспечивает сохранение гомеостаза [1].

ного захвата, переносящей норадреналин против градиента концентрации, иногда в десятки тысяч раз больше внутри адренергических терминалей, чем в окружающей среде. Учитывая это, можно, вероятно, считать, что упомянутый механизм является для норадреналина главным в процессе элиминации катехоламинов из крови. Представленные данные о значительном замедлении скорости элиминации внутривенно введенного норадреналина из крови старых крыс по сравнению с взрослыми свидетельствуют в пользу нарушения процесса обратного захвата норадреналина симпатическими терминалями. Это находится в соответствии с результатами исследований Н. С. Верхратского [10], в которых было показано, что при старении ослабляется как связывание норадреналина белками тканей, так и захват медиатора симпатическими терминалями.

Другой характер имеет элиминация внутривенно введенного адреналина. Неуклонное снижение концентрации введенного вещества приводит к тому, что к 15-й минуте после введения количество адреналина в крови крыс обеих возрастных групп не отличается достоверно от исходного содержания.

Вторым, не менее важным механизмом, играющим значительную роль в элиминации катехоламинов из крови, является их катаболизм в тканях при участии главным образом КОМТ [5—7]. Действию этого фермента адреналин подвержен в большей степени, чем норадреналин, который быстрее разрушается МАО [7]. Это позволяет предположить, что элиминация адреналина из крови определяется в отличие от норадреналина не столько связыванием, сколько катаболизмом в тканях при участии КОМТ. Этот вывод на фоне полученных данных об одинаковой скорости элиминации адреналина из крови крыс разного возраста вполне согласуется с данными авторов [11, 12], которые не обнаружили изменения активности КОМТ в старости.

Как известно [7, 14, 15, 17], связывание катехоламинов тканями и обратный захват их симпатическими терминалями являются процессами немедленного действия, направленными на активное и быстрое удаление биологически активных веществ из сферы взаимодействия их с рецепторами. Поскольку элиминация норадреналина из крови обусловлена именно этим механизмом, можно полагать, что после внутривенного введения адреналина и норадреналина уровень последнего в первые секунды снизится более значительно, чем содержание адреналина, механизм элиминации которого в большей степени связан с интенсивностью катаболизма катехоламинов в тканях.

С этих позиций представляется возможным именно таким образом оценить различный характер элиминации катехоламинов сразу после их поступления в сосудистое русло и, в частности, обнаруженный факт более низкого содержания норадреналина в крови через 10 с после его введения по сравнению с уровнем введенного адреналина, хотя оба катехоламина вводили в одинаковой дозе.

Значительное замедление скорости инактивации экзогенных либо эндогенных катехоламинов, наблюдаемое с возрастом, может приводить к тому, что адреналин и норадреналин, дольше находясь в сфере своего действия, будут вызывать длительные, затяжные функциональные и обменные эффекты. Это необходимо учитывать как при назначении адреномиметиков лицам пожилого и старческого возраста, так и при создании для них особого щадящего режима, исключаяющего различные нервно-психические влияния, при которых происходит резкая активация симпатико-адреналовой системы и выброс катехоламинов в кровь.

Последнее обстоятельство приобретает особое значение в связи с тем, что, согласно современным представлениям, катехоламинам отводится важная роль в формировании в артериальных сосудах дистрофических изменений, которые в последующем являются основой для отложения холестерина и развития атеросклероза. Показано, например, что степень липоидоза сосудов у кроликов, получавших в течение месяца одновременно с холестерином катехоламины, была значительно выше, чем у животных, которые

ном мозге, что характерно также для взрослых животных других видов — кроликов [9] и крыс [11]. Низкие величины УА цереброзидов объясняются тем, что у взрослых животных с законченным миелиногенезом вновь синтезируются лишь незначительные количества цереброзидов [12]. В то же время высокая УА ганглиозидов, в 40—60 раз превышающая УА цереброзидов, обусловлена, по-видимому, многообразием их функций в ЦНС и их преимущественной локализацией в нейрональных структурах, отличающихся высокой функциональной и метаболической активностью.

Кроме того, следует отметить значительно более высокую интенсивность включения метки в гликолипиды спинного мозга по сравнению со стволом головного мозга, что также было отмечено нами у кроликов [9] и свидетельствует о более высокой активности синтеза липидов в спинном мозге.

В паралитической стадии заболевания, вызванного хронической интоксикацией ТОКФ, величина УА цереброзидов и ганглиозидов в спинном мозге не изменяется. В стволе головного мозга УА цереброзидов несколько снижается, в то время как УА ганглиозидов значительно повышается (см. таблицу).

УА гликолипидов, гомогената и КРФ ствола головного и спинного мозга морских свинок в норме и при интоксикации ТОКФ

Фракция	Спинной мозг*			Ствол головного мозга		
	контроль (8)**	ТОКФ (8)	P	контроль (8)	ТОКФ (8)	P
Цереброзиды, имп/мин/мг	26±2	25±3	>0,7	17±1	13±1	<0,05
Ганглиозиды, имп/мин/мг	1588±86	1557±49	>0,8	714±39	1075±97	<0,01
Гомогенат, имп/мин на 1 мг сухой массы	270±9	400±4,7	<0,02	423±22	668±79	<0,02
КРФ, имп/мин/КРФ из 1 мг влажной ткани	42±4	71±8	<0,02	51±9	80±8	<0,05

* Ганглиозиды выделены из целого спинного мозга, цереброзиды — из наиболее повреждаемого пояснично-крестцового отдела.

** В скобках — число исследованных животных.

Для правильной оценки направленности метаболических сдвигов необходимо учитывать изменения фонда радиоактивных предшественников в ткани. Хроническая интоксикация ТОКФ, как видно из таблицы, приводит к значительному повышению УА гомогената как головного, так и спинного мозга за счет увеличения фонда неиспользованных низкомолекулярных радиоактивных предшественников синтеза липидов (КРФ), по-видимому, в результате торможения некоторых окислительных процессов [13], что не может не отразиться на скорости реакций синтеза липидов и величине их УА. В связи с этим изменения в интенсивности синтеза гликолипидов мы, как и ранее [9], оценивали по величине относительной удельной радиоактивности (ОУА) углерода (С) этих липидов по сравнению с УА углерода гомогената, которую принимали за 100:

$$\text{ОУА } C_{\text{лип}} = \frac{\text{УА } C_{\text{лип}} (\text{имп/мин/мг}, C_{\text{лип}})}{\text{УА } C_{\text{гом}} (\text{имп/мин/мг}, C_{\text{гом}})} \cdot 100.$$

Результаты соответствующих расчетов, выраженные графически (см. рисунок, А), свидетельствуют об отчетливом снижении интенсивности синтеза цереброзидов при интоксикации ТОКФ как в стволе головного (на 47%), так и в спинном мозге (на 38%). Принимая во внимание, что главным местом синтеза типичных «миелиновых» липидов — цереброзидов, являются олигодендроциты, можно думать, что нейротоксическое действие ТОКФ и других «диемиелинизирующих» ФОС направлено на метаболизм олигодендроцитов.

Увеличивающееся в последние годы число сообщений о тяжелых поражениях нервной системы в результате хронической интоксикации людей фосфорорганическими соединениями (ФОС), широко применяющимися в сельском хозяйстве и промышленности [1—4], выдвигает в число наиболее актуальных проблем изучение механизма нейротоксического действия ФОС, вызывающих специфическую демиелинизацию нервной ткани. К настоящему времени описано более 40 «демиелинизирующих» ФОС. Все они вызывают сходную картину поражения в эксперименте и клинике, однако механизм их демиелинизирующего действия не изучен. В то же время сама специфика поражений, а именно, повреждение структуры миелиновых оболочек, подтвержденное морфологическим анализом [5, 6], подсказывает необходимость исследования нарушений метаболизма мембранных компонентов миелиновых оболочек и других структур нервной ткани. Исследование синтеза гликолипидных компонентов мембранных структур с применением радиоактивных предшественников могло бы дать ценную информацию о состоянии метаболизма липидов нервной ткани при интоксикации «демиелинизирующими» ФОС. Однако до сих пор подобных исследований не проводилось.

В настоящей работе мы ставили задачу исследовать на экспериментальной модели хронической интоксикации ТОКФ нарушения синтеза цереброзидов, локализованных преимущественно в миелине, и ганглиозидов, которые являются компонентами нейрональных мембран. В качестве радиоактивного предшественника синтеза этих липидов использовали 2-¹⁴C-ацетат.

М е т о д и к а

Опыты ставили на взрослых морских свинках-самцах массой 350—450 г, которым однократно внутривенно инокулировали триортокрезилфосфат (ТОКФ; маслоподобная техническая смесь, содержащая 37% ортоизомеров) в дозе 2—2,2 мл/кг. Постепенное всасывание ТОКФ из внутривенного дено моделировало хроническую интоксикацию. Степень тяжести заболевания оценивали по неврологическим и общим симптомам, используя специальные тесты, разработанные Ю. Д. Зильбером [7] и Э. А. Дворкиным [8]. В паралитической стадии заболевания (через 27—33 дня после инокуляции ТОКФ) животным вводили подкожно 2-¹⁴C-ацетат в дозе 100 мкКи на 100 г массы тела, через 2 ч их декапитировали и извлекали спинной мозг и ствол головного мозга для биохимического анализа. Экстракцию липидов из гомогената ткани, выделение очищенных фракций цереброзидов и ганглиозидов, а также их количественное определение проводили по методам, описанным нами ранее [9, 10]. Радиоактивность цереброзидов и ганглиозидов измеряли на газопотоочном счетчике марки «Протока». Кроме того, определяли радиоактивность гомогената спинного мозга и ствола головного мозга, а также радиоактивность кислоторастворимой фракции (КРФ) этих отделов ЦНС для оценки фона радиоактивных предшественников [9].

Разность средних величин считали достоверной при значениях $P \leq 0,05$.

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

После инокуляции ТОКФ у всех животных в течение 1-й недели наблюдались симптомы острой интоксикации, от которой часть животных (~16%) погибала. У остальных животных в последующие 2—3 нед наблюдалась фаза восстановления. Симптомы нейронального действия ТОКФ (атаксия, ослабление тонуса межреберных мышц, уменьшение межпальцевого расстояния, увеличение длины свободно свисающей лапы) появлялись на 4-й неделе после инокуляции ТОКФ и в дальнейшем прогрессировали, приводя к развитию парезов и параличей конечностей (чаще задних), на фоне вторичного ухудшения общего состояния животных и снижения массы тела на 15—20% с летальным исходом в особо тяжелых случаях. Для биохимического анализа были отобраны животные со средней и тяжелой формой заболевания.

Результаты, представленные в таблице, показывают прежде всего колоссальное различие в интенсивности синтеза двух исследуемых гликолипидов: крайне низкие величины удельной радиоактивности (УА) цереброзидов по сравнению с УА ганглиозидов как в стволе головного, так и в спин-

получали один холестерин [19]. Иначе говоря, преобладание симпато-адренергических реакций может способствовать развитию более выраженных нарушений в липидном обмене и, таким образом, являться одним из звеньев в сложной патогенетической цепи атеросклеротического поражения сосудов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фролькис В. В. Регулирование, приспособление и старение. Л., 1970. —
2. Фролькис В. В. Приспособительные возможности стареющего организма. Киев, 1968, с. 11. —
3. Фролькис В. В., Богацкая Л. Н. — В кн.: Кровообращение и старость. Киев, 1965, с. 104. —
4. Фролькис В. В., Верхратский Н. С., Замостьян В. П. — Физиол. ж. СССР, 1967, т. 53, с. 330. —
5. Кулинский В. И. — Пробл. эндокринологии, 1968, № 2, с. 115. —
6. Кулинский В. И. — В кн.: Физиология и биохимия биогенных аминов. М., 1969, с. 271. —
7. Axelrod J. — *Physiol. Rev.*, 1959, v. 30, p. 751. —
8. Богацкая Л. Н., Воронков Г. С. — В кн.: Белорусская конф. геронтологов и гериатров. 1-я. Тезисы докладов. Минск, 1971, с. 108. —
9. Воронков Г. С. — В кн.: Международный конгресс геронтологов. 9-й. Материалы. Киев, 1972, т. 3, с. 58. —
10. Верхратский Н. С. Обмен медиаторов и реакция эффекторов на холинергические и адренергические влияния в старости. Автореф. дис. докт. Киев, 1971. —
11. Geu K. F., Burkard W. P., Pletscher A. — *Helv. physiol. Acta*, 1964, v. 22, p. 17. —
12. Geu K. F., Burkard W. P., Pletscher A. — *Gerontologia*, 1965, v. 11, p. 1. —
13. Матлина Э. Ш., Меньшиков В. В. и др. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. М., 1966, с. 91. —
14. Iversen L. L. — *Nature*, 1967, v. 214, p. 8. —
15. Korin I. J. — *Pharmacol. Rev.*, 1966, v. 18, p. 512. —
16. Rosell S., Axelrod J., Korin I. J. — *Nature*, 1964, v. 201, p. 301. —
17. Roston S. — *Ibid.*, 1967, v. 215, p. 432.

Поступила 17/IX 1977 г.

ELIMINATION OF ADRENALINE AND NORADRENALINE FROM BLOOD OF RATS OF VARIOUS AGE

G. S. Voronkov

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

Elimination of adrenaline and noradrenaline from blood of adult and old rats was studied within different periods after administration of the catecholamines. Adrenaline was eliminated from blood of rats of both age groups with the similar rate; however, the time of elimination of noradrenaline was distinctly longer in old animals as compared with the adult ones. The alterations observed may be due to the effects of sympathetic system on metabolic processes in various tissues in the old age.

УДК 615.917'563.13'021'118.07:616.831/.832-008.939.52-074

Н. П. Таранова

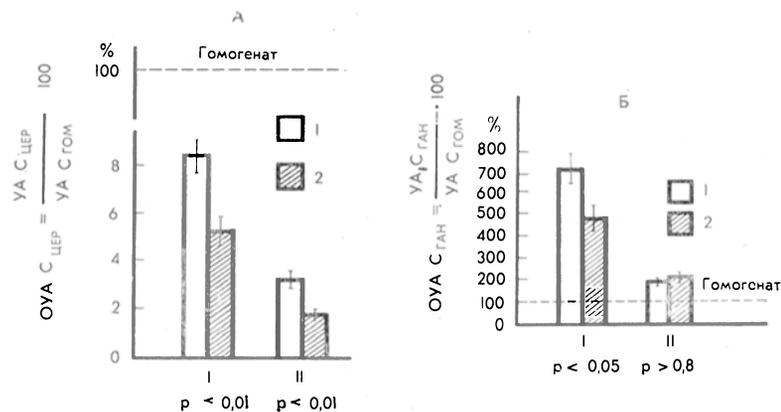
ВКЛЮЧЕНИЕ 2-¹⁴C-АЦЕТАТА В ГЛИКОЛИПИДЫ СПИННОГО И СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА МОРСКИХ СВИНОК В НОРМЕ И В ПАРАЛИТИЧЕСКОЙ СТАДИИ ИНТОКСИКАЦИИ ТРИОРТОКРЕЗИЛФОСФАТОМ

Кафедра биохимии I Ленинградского медицинского института

Нейропаралитическую форму хронической интоксикации триортокрезилфосфатом (ТОКФ) вызывали у морских свинок путем однократной внутрикожной инокуляции ТОКФ. У животных с тяжелой формой заболевания исследовали включение 2-¹⁴C-ацетата в цереброзиды и ганглиозиды спинного и ствола головного мозга *in vivo*. Установлено, что в норме интенсивность включения метки в гликолипиды в спинном мозге значительно выше, чем в стволе головного. В паралитической стадии заболевания, вызванного ТОКФ, в стволе головного и спинном мозге наблюдается угнетение синтеза цереброзидов, локализованных преимущественно в миелиновых мембранах. В спинном мозге снижается также интенсивность включения метки в ганглиозиды. Это доказывает, что нейротоксическое действие ТОКФ направлено не только на метаболические процессы олигодендроглии, но затрагивает также метаболизм нейронов, где происходит синтез ганглиозидов.

Более того, мы обнаружили также значительное угнетение (на 32%) синтеза ганглиозидов в спинном мозге (см. рисунок, Б). Это доказывает, что действие ТОКФ приводит к повреждению метаболизма не только глиальных, но и нейрональных структур спинного мозга. В стволовой части головного мозга интенсивность синтеза ганглиозидов остается без изменений, что свидетельствует, по видимому, о большей резистентности нейрональных структур головного мозга к нейротоксическому действию ТОКФ по сравнению со спинным мозгом.

Характер нарушений метаболизма гликолипидов при демиелинизации, вызванной ТОКФ, обнаруживает поразительное сходство с тем, что мы на-



ОУА С цереброзидов (А) и ганглиозидов (Б) (в % к величине УАУС гомогената) ствола головного (II) и спинного (I) мозга морских свинок в норме (1) и при интоксикации ТОКФ (2).

блюдали ранее при экспериментальной демиелинизации аллергического происхождения [9]. Однотипность метаболических сдвигов, вызванных столь различными патогенными факторами, позволяет высказать предположение о том, что в основе развития ряда демиелинизирующих заболеваний лежит единый механизм патогенеза независимо от характера повреждающего патогенного фактора. Существенным звеном в этом механизме, по-видимому, следует считать перестройку обмена олигодендроцитов, приводящую к деструкции миелиновых мембран в результате активизации лизосомальных ферментов липолиза и угнетения ферментных систем синтеза цереброзидов и других липидных компонентов миелина [13, 14]. Немаловажным фактором в патогенезе демиелинизирующих заболеваний является также нарушение нейрональных метаболических систем синтеза ганглиозидов — важнейших компонентов синаптических мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cavanagh J. B. — *C. R. C. Crit. Rev. Toxicol.*, 1973, v. 2, p. 365. —
2. Baggusand D., Maargsofi M. — *Ann. méd. Nancy*, 1972, v. 11, p. 848. —
3. Зильбер Ю. Д. — В кн.: Актуальные вопросы промышленной токсикологии. Л., 1970, с. 129. —
4. Прозоровский В. Б., Саватеев Н. В. Неантихолинэстеразные механизмы действия антихолинэстеразных средств. Л., 1976, с. 127. —
5. Barnes J. M., Denz F. A. — *J. Path. Bact.*, 1953, v. 65, p. 597. —
6. Daniele E., Fati S. — *Jn: Internationaler Kongress für Arbeitsmedizin. 15. Abstracts. Wien, 1966, Bd 6, pt 1, S. 351.* —
7. Зильбер Ю. Д., Коновалов Г. В. Озирская Е. В. и др. — В кн.: Вопросы гигиены труда, профпатологии и токсикологии при производстве и использовании фосфорорганических пластификаторов. М., 1973, с. 77. —
8. Дворкин Э. Л. Исследование сравнительной токсичности некоторых эфиров фосфорной кислоты. Автореф. дис. канд. Л., 1972. —
9. Таранова Н. П., Качнельсон И. П. — *Вопр. мед. химии*, 1976, № 1, с. 108. —
10. Таранова Н. П. — Там же, № 4, с. 567. —
11. Таранова Н. П. — *Радиобиология*, 1975, № 6, с. 821. —
12. Nicholls D., Rossiter R. J. —

J. Neurochem., 1964, v. 11, p. 873. — 13. Majno G., Karnovsky M. L. — Ibid., 1961, v. 8, № 1, p. 1. — 14. Porcellati G., Mastrantonio M. A. — Ital. J. Biochem., 1964, v. 13, p. 332.

Поступила 5/IX 1977 г.

INCORPORATION OF 2-¹⁴C-ACETATE INTO GLYCOLIPIDS OF GUINEA PIG BRAIN AND SPINAL CORD IN NORMAL AND IN PARALYTICAL STATE, CAUSED BY TRI-O-CRESYL PHOSPHATE INTOXICATION

N. P. Taranova

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

Paralytical form of chronic intoxication was caused by single intracutaneous administration of tri-O-cresyl phosphate (TOCP)/2=2.2 ml/kg/into guinea pigs. Within the first 27-33 days after the treatment, the animals with pronounced symptoms of neurotoxic effect of TOCP were subcutaneously administered with 2-¹⁴C-acetate/100 μCi per 100 g of body weight/2 hrs before decapitation. Purified cerebrosides, gangliosides and acid-soluble fraction, containing ¹⁴C-precursors, were isolated and their specific radioactivity was measured in a gas-flow counter. The rate of ¹⁴C incorporation into cerebrosides and gangliosides in spinal cord was found to exceed that in brain stem. In paralytical stage of disease, caused by TOCP, synthesis of cerebroside was depressed in spinal cord and in brain stem, according to calculated value for relative specific radioactivity. In spinal cord the rate of ¹⁴C incorporation into gangliosides was also decreased. These data suggest that neurotoxic drug TOCP affects metabolic processes both in oligodendroglial cells and in neurons, where ganglioside biosynthesis occurs.

УДК 612.82.015.11:577.152.143.042.5:547.754

Р. Р. Сафразбекян, Р. С. Сукасян, Э. М. Арзануни

ОБ АКТИВИРУЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ ИНДОЛИЛГИДРАЗИДОВ НА МОНОАМИНОКСИДАЗУ МОЗГА КРЫС

Институт тонкой органической химии АН Армянской ССР, Ереван

Гидразид β-(2-метилиндолил-3)пропионовой кислоты, дигидразид и изопропилдигидразид α-бутил-β-(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты в опытах *in vitro* в низких концентрациях усиливают, в высоких — тормозят активность моноаминоксидазы. Активирующее действие зависит от исходной скорости реакции дезаминирования. Гидразид активирует дезаминирование норадреналина, если скорость реакции в среднем ниже 175 нг азота в 1 мин. Дигидразид и изопропилдигидразид активируют метаболизм серотонина при скорости реакции ниже 208 и 217 нг азота в 1 мин. В опытах *in vivo* препараты в дозе 10—25 мг/кг усиливают дезаминирование норадреналина, что сопровождается понижением содержания амина в мозге.

За последние годы появились сообщения о пониженной активности моноаминоксидазы (МАО) в тромбоцитах больных шизофренией, имеется тенденция рассматривать этот сдвиг как генетический признак подверженности заболеванию [1, 2]. Пониженное содержание 5-оксииндолуксусной и гомованилиновой кислот отмечено в цереброспинальной жидкости больных маниакально-депрессивным психозом [3]. Между тем имеются лишь отдельные сообщения о веществах, способных повышать активность фермента [4—11].

Ранее, изучая свойства α-замещенных триптаминов, а затем гидразидов и дигидразидов индолилпропионовых кислот, мы отметили, что, будучи ингибиторами МАО, препараты в определенных условиях активируют реакцию дезаминирования [12—16]. Цель настоящего исследования — проследить зависимость активирующего действия гидразида и изопропилгидразида β-(2-метилиндолил-3)пропионовой кислоты, дигидразида и изопропилдигидразида α-бутил-β-(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты [16] на МАО в зависимости от исходной активности фермента.

Методика

Определение активности MAO. Использованы крысы-самцы массой 150—200 г. В опытах *in vitro* митохондрии мозга выделены методом дифференциального центрифугирования [17]. Препараты в дозах 0,5, 1, 5 и 50 мкмоль/мл преинкубированы с ферментом в течение 30 мин при комнатной температуре. Субстраты — серотонин (5-ОТ) креатининсульфат («Gee Lawson Chemicals», LTD), триптамин (Т) гидрохлорид («Fegak», Bergin) и норадреналин (НА) гидротартрат (Харьковский завод эндокринных препаратов) добавлены к пробам по 10, 2 и 20 мкмоль соответственно из расчета на основании. Условия инкубации, фиксации и определения аммиака описаны ранее [14, 18]. Скорость

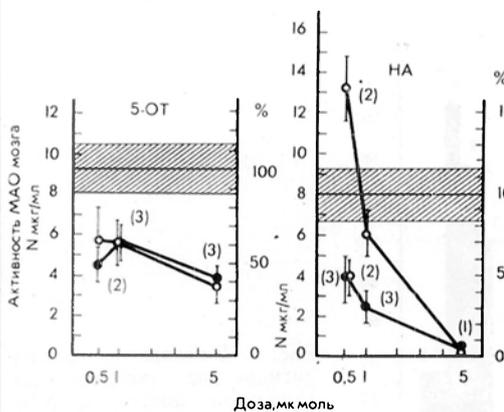


Рис. 1. Влияние гидразид и изопронилгидразид β -(2-метилиндолил-3)пропионовой кислоты на активность MAO митохондрий мозга крыс *in vitro*.

Вертикальные линии — стандартные ошибки, $n=4$. Заштрихованная полоса — средняя активность MAO в контрольных пробах \pm стандартные ошибки. Светлые кружки — гидразид, темные — изопронилгидразид. (1) $P < 0,01$; (2) $P < 0,02$; (3) $P < 0,05$.

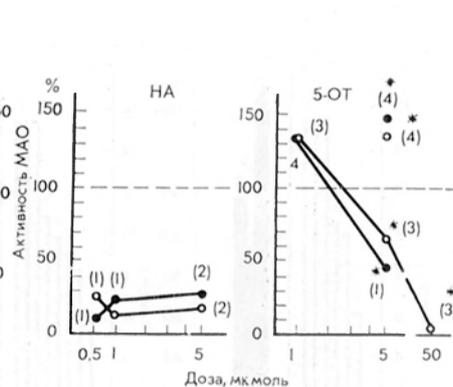


Рис. 2. Влияние дигидразид и изопронилдигидразид α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты на активность MAO митохондрий мозга крыс *in vitro*.

Светлые кружки — дигидразид; темные — изопронилдигидразид, $n=4-7$. (1) $P < 0,01$; (2) $P < 0,02$; (3) $P < 0,05$; (4) $P > 0,05$; * $n=3$.

дезаминирования определена по количеству образующегося азота в нанogramмах в 1 мин. За исходную (V_0) принята скорость дезаминирования в контрольных пробах, не содержащих препарата; V — скорость дезаминирования в пробах, преинкубированных с исследуемыми соединениями.

В опытах *in vivo* препараты введены крысам подкожно в дозах 10, 25, 50 и 100 мг/кг за 1 ч до декапитации. Контрольные животные получали физиологический раствор. В каждую группу взято по 4—6 крыс. Источником MAO служили 50% гомогенаты мозга. Получение гомогенатов, состав реакционной среды, условия инкубации и фиксации проб описаны ранее [14—16, 18]. Содержание белка в гомогенатах определяли по методу Кьельдала [18, 19].

Определение содержания 5-ОТ и НА в гомогенатах мозга. Исследуемые препараты в дозах 10, 25 и 100 мг/кг введены крысам подкожно за 1, 3 и 18 ч до декапитации. Амины выделены из гомогенатов мозга методом ионообменной хроматографии на смоле амберлита IRC-50, Na^+ -формы. Условия гомогенизации, обработки смолы, хроматографии и флюорометрии описаны ранее [20—22]. Средние высчитаны из 4—8 опытов. Результаты обработаны по Стьюденту — Фишеру.

Результаты и обсуждение

В опытах *in vitro* гидразид β -(2-метилиндолил-3)пропионовой кислоты в дозах 0,5, 1 и 5 мкмоль/мл угнетает дезаминирование 5-ОТ (рис. 1). Действие препарата на дезаминирование НА зависит от дозы: при 0,5 мкмоль/мл в одних опытах усиливает дезаминирование, в других — тормозит, при 1 мкмоль/мл не оказывает влияния, при 5 мкмоль/мл вызывает полное торможение. Изопронилгидразид в этих условиях тормозит дезаминирование и 5-ОТ, и НА. Оба препарата не влияют на дезаминирование Т.

Дигидразид и изопронилдигидразид α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты, как видно из рис. 2, в дозе 0,5—5 мкмоль/мл

угнетают дезаминирование НА в среднем на 70—90%. В дозе 1 мкмоль/мл оба препарата повышают интенсивность дезаминирования 5-ОТ. Достоверное усиление на $33 \pm 9\%$ вызывает только дигидразид. С повышением концентрации препаратов до 5 и 50 мкмоль развивается ингибирование MAO. На дезаминирование Т препараты не влияют. Как видно из рис. 3, в опытах *in vitro* активирующее влияние изопропилдигидразида α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты на дезаминирование 5-ОТ проявляется чаще в тех случаях, когда исходная активность MAO низкая (пробы 1 и 3 при 1 мкмоль/мл и пробы 2, 3, 4 при 5 мкмоль/мл). При высокой

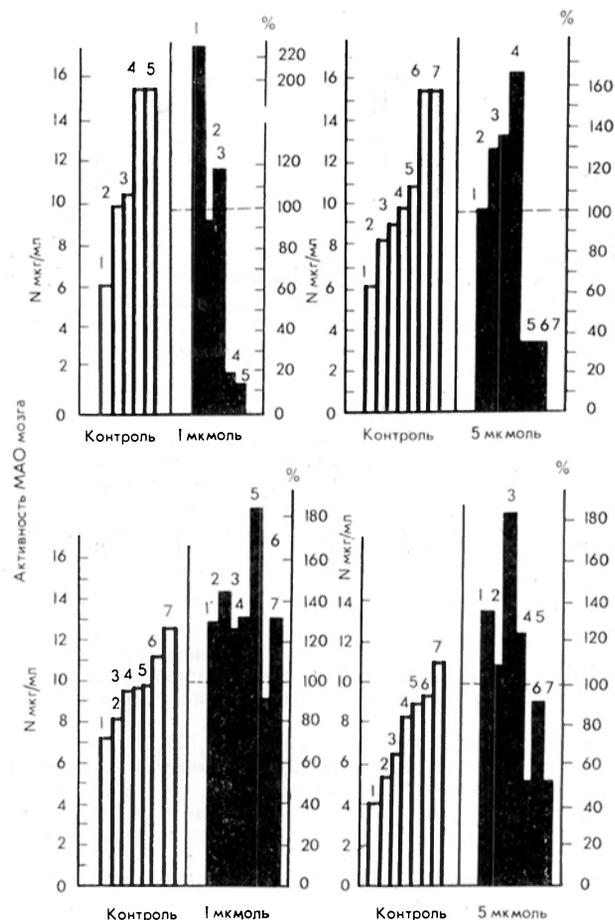


Рис. 3. Влияние изопропилдигидразида (вверху) и дигидразида (внизу) и α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты на дезаминирование 5-ОТ в зависимости от исходной активности MAO митохондрий мозга крыс.

Опытные пробы (темные столбики) и соответствующие им контроли (светлые столбики) обозначены одинаковыми цифрами. Изменение активности выражено в процентах к контролю.

активности фермента препарат оказывает ингибирующее действие (пробы 4 и 5 при 1 мкмоль/мл и пробы 5, 6 и 7 при 5 мкмоль/мл). Такая же зависимость действия препарата от активности фермента отмечена после преинкубации MAO с дигидразидом α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты в дозе 5 мкмоль/мл. При концентрации препарата 1 мкмоль/мл его активирующее действие на дезаминирование 5-ОТ не зависит от исходной активности (см. рис. 3). Ипразид в дозе 10^{-8} мкмоль/мл угнетает дезаминирование 5-ОТ и НА на 76 и 72% ($P < 0,001$ и $0,01$). Однако при низкой активности фермента в отдельных случаях можно наблюдать активацию. Как видно из рис. 4, намечается некоторая линейная зависимость между исходной скоростью дезаминирования V_0 и изменением активности V/V_0 под влиянием препарата. Гидразид β -(2-метилиндолил-3)пропионовой кислоты в дозе 0,5 мкмоль/мл активирует дезаминирование НА, когда скорость реакции ниже 175 нг азота в 1 мин. Дигидразид и изопропил-

дигидразид в дозе 5 мкмоль/мл активируют метаболизм 5-ОТ при скорости ниже 208 и 217 нг азота в 1 мин.

В опытах *in vivo* через 1 ч после введения крысам гидразида β -(2-метилиндолил-3)пропионовой кислоты в дозе 10 мг/кг у части животных ($n=3$) отмечено резкое усиление дезаминирования НА: количество образующегося аммиака достигает 1206 ± 195 нмоль на 1 мг белка, тогда как у контрольных крыс оно не превышает 480 ± 36 нмоль/мг белка. У остальных животных ($n=4$) активность фермента угнетена в среднем на 76,5%. Оба эффекта достоверны ($P < 0,001$). Спустя полчаса после введения препарата количество НА в ткани мозга снижается с $0,37 \pm 0,02$ мкг/г у контрольных животных до $0,26 \pm 0,02$ мкг/г у леченых, что согласуется с усилением дезаминирования.

Изопропилдигидразид β -(2-метилиндолил-3)пропионовой кислоты тормозит дезаминирование 5-ОТ на 76,5% ($P < 0,001$) и НА — на 48% ($P < 0,001$) через 1 ч после введения в дозе 100 мг/кг. Содержание аминов в мозге возрастает лишь спустя 18 ч: 5-ОТ — на 64% ($P < 0,002$) и НА — на 29% ($P < 0,05$). Меньшие дозы препарата не влияют на активность MAO и содержание аминов мозга.

Дигидразид α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты в дозе 25 мг/кг и изопропилдигидразид в дозе 10 мг/кг, как видно из рис. 5, усиливают дезаминирование НА гомогенатами мозга на 50 и 35% соответственно. Наряду с повышением активности MAO понижается содержание НА после введения дигидразида — на 30—35% в течение 2 ч и после введения изопропилдигидразида — на 12% в течение 1-го часа. На дезаминирование 5-ОТ и его содержание в мозге препараты не влияют.

Таким образом, при изучении влияния на MAO гидразида β -(2-метилиндолил-3)пропионовой кислоты, а также дигидразида и изопропилдигидразида α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты в опытах *in vitro* выявлена определенная зависимость действия препаратов от присущей ферменту активности. Пониженная активность фермента — наиболее благоприятный «фон» для выявления активирующего действия. Однако, имеется некоторый «критический уровень» активности, в ту и другую сторону от которого наиболее вероятно развитие угнетения или активации. В наших опытах этот уровень активности, выражен-

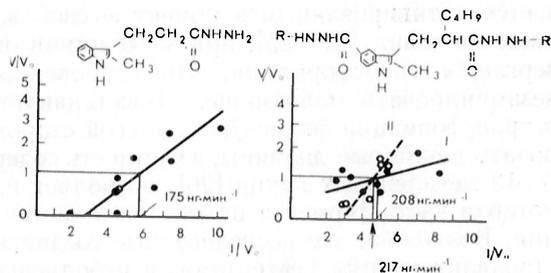


Рис. 4. Изменение активности MAO митохондрий мозга в зависимости от исходной скорости реакции дезаминирования.

V_0 — исходная скорость дезаминирования; V — скорость дезаминирования после 30 мин преинкубации митохондрий с препаратами. Значения V/V_0 нанесены по логарифмической шкале. Слева: гидразид β -(2-метилиндолил-3)пропионовой кислоты в дозе 0,5 мкмоль, субстрат — НА. Справа: темные кружки (I) — дигидразид, светлые (II) — изопропилдигидразид α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты в дозе 5 мкмоль, субстрат — 5-ОТ.

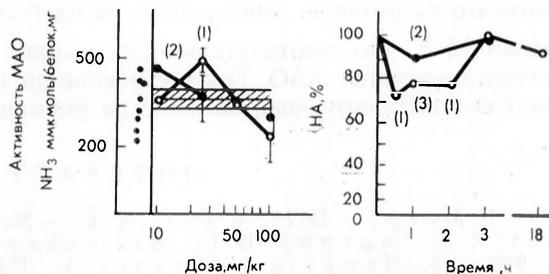


Рис. 5. Влияние дигидразида и изопропилдигидразида α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)пропионовой кислоты на активность MAO и содержание НА в гомогенатах мозга крыс.

Дигидразид введен по 25 мг/кг подкожно, изопропилдигидразид — по 10 мг/кг, $n=4-8$. Слева: препараты введены за 1 ч до декапитации. Слева: за 100% принято среднее содержание НА у контрольных животных. Светлые кружки — $R=H$, темные — $R=CH(CH_3)$. Слева: (1) $P < 0,02$; (2) $P < 0,05$. Справа: (1) $P < 0,002$; (2) $P < 0,01$; (3) $P < 0,05$.

ный в скорости дезаминирования, определен для 5-ОТ в пределах 208—217 нг в 1 мин, для НА — 175 нг азота в 1 мин. Не исключено, что для других субстратов и других препаратов «критические уровни» окажутся иными.

В настоящее время о механизмах развития активации можно высказать лишь некоторые предположения. Возможно, индолилгидразиды образуют с MAO комплексы, которые при кратковременной инкубации и низких дозах неустойчивы и легко распадаются. Фермент как катализатор оказывается активированным в момент высвобождения. Как описано В. З. Горкиным и соавт. [23—25], при воздействии окисляющих факторов MAO подвергается трансформации, что сопровождается понижением способности дезаминировать моноамины. Восстанавливающие реагенты способствуют ретрансформации фермента. С другой стороны, способность MAO дезаминировать некоторые диаминны, в частности содержащие алифатическую цепь из 7—13 метиленовых групп [26], позволяет предположить, что и в норме некоторая часть фермента находится в частично трансформированном состоянии. Возможно, что исследованные соединения, будучи как гидразиды восстанавливающими реагентами, в небольших дозах и при кратковременной инкубации действуют на трансформированную часть MAO, ретрансформируя ее. Лишь позже развивается ингибирование. Как было показано выше, активизирующее действие особенно выражено у дигидразида α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксининдолил-3)пропионовой кислоты. Расстояние между конечными атомами азота (H_2N-NH_2) в диаминах с 7—13 метиленовыми группами, вычисленное в лаборатории физико-химических исследований Института тонкой органической химии АН Армянской ССР Р. Л. Авояном по стандартным значениям длин связей и валентных углов, составляет 10—17 Å. В дигидразидах α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксининдолил-3)пропионовой кислоты это расстояние, вычисленное по наиболее вероятной модели молекулы, равно 12 Å, что соответствует расстоянию в диаминах, наиболее подверженных влиянию MAO. Такое строение дигидразида, очевидно, и обеспечивает ему активизирующее влияние на фермент.

ЛИТЕРАТУРА

1. Murphy D. L., Wyatt R. L. — Nature, 1972, v. 238, p. 225. — 2. Wyatt R. J., Murphy D. L., Belmaker R. et al. — Science, 1973, v. 179, p. 916. — 3. Mendels J., Frazer A., Fitzgerald R. G. et al. — Ibid., 1972, v. 175, p. 1380. — 4. Schroder H. A. — In: Hypertension Ed. J. Moyer. Philadelphia, 1959, p. 180. — 5. Cotzias G., Greenough J. — Nature, 1960, v. 185, p. 384. — 6. Gömöri P., Skolnik J. — Arch. int. Pharmacodyn., 1964, v. 150, p. 1. — 7. Izumi F., Oka M., Yoshida H. et al. — Life Sci., 1967, v. 6, p. 2333. — 8. Izumi F., Oka M., Yoshida H. et al. — Biochem. Pharmacol., 1969, v. 18, p. 1739. — 9. Yamamoto I., Oka M., Iwata H. — Ibid., 1970, v. 19, p. 1831. — 10. Киселева И. П. — Вопр. мед. химии, 1972, № 5, с. 502. — 11. Ванерjee A., Poddar M. K., Saha S. et al. — Biochem. Pharmacol., 1975, v. 24, p. 1435. — 12. Terzian A. G., Safrazbekian R. R., Sukasian R. S. et al. — Experientia (Basel), 1961, v. 17, p. 493. — 13. Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С. — Фармакол. и токсикол., 1964, № 2, с. 213. — 14. Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С. — Биол. ж. Армении, 1969, № 10, с. 43. — 15. Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С. — Там же, 1970, № 9, с. 31. — 16. Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С. — Вопр. мед. химии, 1970, № 6, с. 623. — 17. Schneider W. C. — J. biol. Chem., 1948, v. 176, p. 259. — 18. Горкин В. З., Романова Л. А. — Биохимия, 1959, № 5, с. 826. — 19. Горкин В. З., Татьянаенко Л. В., Суворов Н. Н. и др. — Биохимия, 1967, т. 32, с. 1036. — 20. Сафразбекян Р. Р., Лрзаянц Э. М. — Лабор. дело, 1977, № 4, с. 226. — 21. Fleming R. M., Clark W. — Analyt. Chem., 1965, v. 37, p. 692. — 22. Bertler A., Carlsson A., Rosengren E. — Acta physiol. scand., 1958, v. 44, p. 273. — 23. Горкин В. З., Акопян Ж. И., Веревкина И. В. и др. — Биохимия, 1970, т. 35, с. 140. — 24. Горкин В. З. — Вопр. мед. химии, 1972, № 2, с. 118. — 25. Горкин В. З. — Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1976, т. 21, № 2, с. 181. — 26. Blaschko H. — Pharmacol. Rev., 1952, v. 4, p. 415.

Поступила 17/1 1978 г.

ON THE ACTIVATING EFFECT OF INDOLYL HYDRAZIDES ON MONOAMINE
OXIDASE FROM RAT BRAIN

R. R. Safrzbeqyan, R. S. Sukasyan, E. M. Arzanuntz

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

Effects of hydrazide and isopropyl hydrazide of β -/2-methyl indolyl-3/propionic acid as well as dihydrazide and isopropyl dihydrazide of α -butyl- β -/2-methyl-5-carboxyindolyl-3/propionic acid on activity of monoamine oxidase from rat brain were studied *in vivo* and *in vitro*. The effects of the preparations depend on the initial activity of the enzyme, concentrations of the compounds and on the substrate used. Decreased monoamine oxidase activity was the most suitable condition for detection of activating effect of compounds studied.

УДК 616-008.944.52-074:543.9

В. И. Кулинский

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
КАТЕХОЛ-О-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ
СОСТОЯНИЯ ОБМЕНА КАТЕХОЛАМИНОВ У ЧЕЛОВЕКА**

Кафедра биохимии Красноярского медицинского института

*На основе сопоставления экскреции катехоламинов с мочой и определения активности катехол-о-метилтрансферазы *in vivo* разработана схема интерпретации состояния обмена катехоламинов у человека и прежде всего активности процесса мобилизации. Приведен ряд клинических примеров, показывающих полезность этого подхода.*

Для клинки наиболее важным показателем обмена катехоламинов (КА) является их мобилизация, т. е. секреция из надпочечников и освобождение из окончаний симпатических нервов. Это связано с тем, что именно мобилизация КА характеризует функциональное состояние обоих эффекторных отделов симпатико-адреналовой системы (САС): увеличенная секреция адреналина (А) свидетельствует о стимуляции гормонального отдела — мозгового вещества надпочечников, а увеличенное освобождение медиатора пораденалина (НА) — об активной деятельности симпатической нервной системы [1—4]. При этом необходимо иметь в виду, что изменения функционального состояния этих двух отделов САС могут быть не только одно-, но и разнонаправленными [5]. Это означает, что необходимо раздельно определять мобилизацию А и НА. К сожалению, прямые методы выявления мобилизации КА недоступны для клинки. В результате мы вынуждены использовать косвенные методы.

В практике наиболее широко используют определение КА в биологических жидкостях: исследуют концентрацию КА в крови или их экскрецию с мочой. Хорошо известно, что интерпретация этих показателей не является однозначной [6]. В самом деле, содержание любого вещества в жидкости или ткани определяется соотношением двух противоположных процессов: поступления (синтеза) и выведения (метаболизма). Для КА биологических жидкостей такими процессами являются мобилизация в тканях и инактивация. Например, увеличенная экскреция КА может иметь место как при усилении мобилизации КА в организме, так и при снижении метаболизма [3, 7]. К сожалению, о последнем нередко забывают. Естественно, оценка функционального состояния САС в этих двух ситуациях будет различной.

В последнее время при изучении обмена КА в клинке имеется тенденция применять целую «батарею тестов», при этом рамки этой «батареи» все расширяются [3, 8]. В принципе это следует только приветствовать, но необходимо ясно представлять, что постановка большого количества очень разных методик доступна только профильным и мощным гормональным лабораториям, количество которых измеряется единицами.

Мы предложили для оценки обмена КА использовать определение активности катехол-о-метилтрансферазы — КОМТ [6]. КОМТ — основной фермент, метаболизирующий внеклеточные, в том числе циркулирующие КА. Эндогенные КА становятся субстратом КОМТ только после мобилизации. В этом заключается основное функциональное отличие КОМТ от другого важного фермента обмена КА — моноаминоксидазы (МАО). Упрощая, можно сказать, что КОМТ метаболизирует «работающие» КА, а МАО — «запасные». Это четко показывает важность определения КОМТ в клинике. Разработанная нами методика подробно описана [9]. С практической точки зрения важным преимуществом методики является то, что она принципи-

Оценка мобилизации КА в организме по изменению их концентрации в биологических жидкостях и активности КОМТ

Вариант	Изменение уровня А или НА в суточной моче	Изменение активности КОМТ	Изменение мобилизации А или НА (оценка)	Клинический пример
1	Повышение	Норма	Повышение	Холецистит, неактивный хронический гепатит (А), легкий вирусный гепатит у детей (А)
2	Снижение	Норма	Снижение	Легкий вирусный гепатит у детей (НА)
3	Повышение	Повышение	Сильное повышение	Язвенная болезнь (А), ревматизм АII—III(А)
4	Снижение	Снижение	Сильное снижение	Вирусный гепатит в среднетяжелой и тяжелой форме в 11—15 лет (НА)
5	Норма	Повышение	Повышение	Беременность (А)
6	Норма	Снижение	Снижение	Активный хронический гепатит (НА)
7	Повышение	Снижение	Неоднозначно	Активный хронический гепатит (А), цирроз (А, НА), тяжелый вирусный гепатит у взрослых и детей (А)
8	Снижение	Повышение	Неоднозначно	Язвенная болезнь (НА), беременность с начальными явлениями токсикоза (А)

Примечание. В таблице использованы данные, полученные совместно с кафедрами госпитальной терапии, инфекционных болезней, детских инфекций, акушерства и гинекологии лечебного факультета, детских болезней лечебного факультета.

ально ничем не отличается от определения КА (те же оборудование и реактивы) и, следовательно, может быть легко поставлена. Если активность КОМТ в организме человека оценена, то интерпретация состояния САС становится намного более определенной. Это связано с тем, что из двух факторов, влияющих на концентрацию КА (мобилизации и инактивации), один становится известным. Правда, следует оговорить, что циркулирующие КА инактивируются не только КОМТ, но и процессами депонирования. Однако существенные изменения последних в клинике не были пока продемонстрированы. Поэтому в настоящее время можно принять, что при патологии изменения инактивации КА, во всяком случае в основном, определяются изменениями активности КОМТ.

Рассмотрим основные ситуации (см. таблицу). Общий принцип заключается в оценке направленности сдвига неизвестного параметра — мобилизации КА — на основе знания направленности изменений двух других величин: концентрации (количества) КА в биологических жидкостях и активности КОМТ. Мы уже указывали, что повышение концентрации КА в крови или их экскреции с мочой может быть результатом либо увеличенной мобилизации, либо сниженного метаболизма. Если последний не изменяется (активность КОМТ нормальна), то повышенная экскреция КА свидетельствует об их усиленной мобилизации — А, НА или обоих (вариант 1).

Очевидно, что это же явление, и при этом в еще большей степени, имеет место, если уровень того или другого катехоламина повышен при повышенной активности КОМТ (вариант 3). В самом деле, при возросшем метаболизме КА их уровень (обоих или одного) будет повышаться только при особенно усиленной мобилизации. По тем же причинам снижение экскреции КА при нормальной (вариант 2) и особенно при сниженной активности КОМТ (вариант 4) позволяет думать о снижении мобилизации КА в организме.

Разберем иную ситуацию — отсутствие изменений концентрации КА при явных сдвигах в активности КОМТ. Естественно ожидать, что активация фермента должна привести к усиленному метаболизму циркулирующих КА и в результате к снижению их концентрации. Если этого не происходит (вариант 5), значит имеется противоположно действующий фактор, — им скорее всего является увеличенное поступление КА в кровоток. Аналогичным путем приходим к заключению, что при сниженной активности КОМТ и нормальной концентрации или экскреции КА мобилизация должна быть снижена (вариант 6).

Самыми сложными для оценки являются варианты с противоположно направленными изменениями концентрации КА и активности КОМТ. На первый взгляд, повышение, например, уровня А при снижении активности КОМТ является прямым результатом последнего. Однако накопление гормона может быть и результатом двух независимых причин: снижения метаболизма и увеличения секреции. Наконец, если метаболизм КА упадет очень резко, то их уровень может повыситься не только при нормальной, но и при сниженной мобилизации, т. е. даже в условиях пониженной активности САС. Последняя ситуация заслуживает особого внимания, так как показывает, насколько осторожным следует быть в функциональной интерпретации сдвигов в концентрации КА при неизвестной активности КОМТ. Точно так же снижение концентрации (экскреции) КА при повышенной активности КОМТ может иметь место при нормальной, сниженной и даже увеличенной мобилизации КА (вариант 8). Общим для этих ситуаций является то, что изменение активности КОМТ может вносить существенный вклад в изменение содержания КА. В таблице приведены также примеры клинических ситуаций, когда указанные варианты встречались реально в нашей совместной работе с клиницистами.

Таким образом, если обнаружен сдвиг одного из показателей (КА или КОМТ) или они изменяются односторонне, то мобилизация КА скорее всего изменена в ту же сторону. При противоположно направленных сдвигах КА и КОМТ определенного заключения сделать нельзя. Естественно, эта общая схема оценки может конкретизироваться в зависимости от выраженности сдвигов того или другого показателя, от их динамики и наличия дополнительных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Euler U. S. — Clin. Pharmacol. Ther., 1964, v. 8, p. 398. — 2. Утесский А. М., Кулинский В. И. — Пробл. эндокринолог., 1967, № 5, с. 84—97. — 3. Матлина Э. Ш., Меньшиков В. В. Клиническая биохимия катехоламинов. М., 1967. — 4. Stout J. R. — Anesthesiology, 1968, v. 29, p. 661—669. — 5. Бару А. М. — Ж. невропатол. и психиатр., 1975, № 8, с. 1211—1217. — 6. Кулинский В. И. — В кн.: Всесоюзный съезд эндокринологов. Тезисы докладов. М., 1972, с. 191. — 7. Кулинский В. И. — Пробл. эндокринолог., 1968, № 2, с. 115—125. — 8. Большакова Т. Д. Некоторые показатели обмена катехоламинов при физиологических и патологических состояниях у людей. Дис. докт. М., 1973. — 9. Кулинский В. И., Оловяникова Р. Я. — Вопр. мед. химии, 1976, № 5, с. 708—712.

Поступила 12/IX 1977 г.

SIGNIFICANCE OF THE DATA ON THE ACTIVITY OF CATECHOL-O-METHYL TRANSFERASE FOR EVALUATION OF HUMAN CATECHOLAMINE TURNOVER

V. I. Kulinsky

Chair of Biochemistry, Medical School, Krasnoyarsk

Conclusions on the state of catecholamine turnover in men and evaluation of mobilization of catecholamines were based on the data on correlation between urinary excretion of catecholamines and estimated values of catechol-O-methyl transferase activity *in vivo*. Results of studies carried out in some human diseases are discussed to demonstrate the efficiency of this approach.

УДК 612.172.015.348.014.46:577.175.822-053.9

Н. С. Верхратский

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В ОТДЕЛАХ СЕРДЦА ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС

Институт геронтологии АМН СССР, Киев

*В опытах *in vitro* исследовали влияние ацетилхолина на включение меченых аминокислот (¹⁴C-гидролизат белка хлореллы) в фонд свободных аминокислот и тотальные белки срезов предсердий, правого и левого желудочков сердца крыс различного возраста. Об изменениях интенсивности биосинтеза белка судили по сдвигам величины относительной удельной радиоактивности (ОУР = удельная радиоактивность белка : удельная радиоактивность фонда свободных аминокислот). Максимальный прирост величины ОУР отмечен в предсердиях двухмесячных крыс при $2,5 \cdot 10^{-4}$ М ацетилхолина, взрослых — при $1 \cdot 10^{-3}$ М, старых — при $5 \cdot 10^{-4}$ М, в правом желудочке во всех возрастных группах при $1 \cdot 10^{-5}$ М; в левом желудочке во всех возрастных группах изменения величины ОУР статистически недостоверны. Атропин блокирует стимулирующее влияние ацетилхолина на биосинтез белка в предсердиях.*

В настоящее время общепризнанным является существование надклеточного контроля биосинтеза белка. Вместе с тем если о гормональной регуляции этого процесса накоплен большой фактический материал, то в отношении нервных регуляторных влияний данных значительно меньше. В этом плане привлекает внимание цикл работ В. С. Ильина и соавт. [1], которые показали, что денервация резко изменяет биосинтез ключевых ферментов гликолиза, глюконеогенеза и пентозофосфатного пути, «возвращая» уровень активности и характер распределения ферментов в клетках к эмбриональному.

Поскольку передача нервного импульса на эффектор включает медиаторное звено, то нервный контроль биосинтеза белка в клетке определяется в основном влиянием соответствующих медиаторов — ацетилхолина и норадреналина. В литературе имеются данные о влиянии ацетилхолина на функциональные звенья генетического аппарата клетки — репликацию, транскрипцию и трансляцию. Пикалл [2], инкубируя срезы поджелудочной железы голубей с ацетилхолином в конечной концентрации 1 мкг на 1 мл инкубационной среды, обнаружил увеличение соответствующих предшественников в РНК в 2,1 раза и в белок в 1,7 раза по сравнению с контролем. Мак-Манус и соавт. [3] инкубировали суспензию клеток зобной железы крыс с нарастающими концентрациями ацетилхолина — от $1 \cdot 10^{-9}$ до 1×10^{-4} М. Оказалось, что есть две зоны концентраций ацетилхолина — одна более широкая ($5 \cdot 10^{-9}$ до $1 \cdot 10^{-7}$ М), другая более узкая (в пределах 5×10^{-5} М), — при которых происходит стимуляция репликации ДНК и пролиферации тимоцитов. Причем высокие концентрации ацетилхолина были эффективны только в присутствии ионов кальция, тогда как действие низких концентраций не зависело от присутствия кальция в растворе.

В ходе старения, с одной стороны, наступают существенные изменения процесса биосинтеза белка [4], с другой — нейрогуморальной регуляции

обмена и функций тканей [5]. Вместе с тем вопросы возрастных особенностей влияния медиаторов на процессы биосинтеза белка не получали освещения в литературе. Характеристика холинэргической и адреинэргической регуляции биосинтеза белка в старости позволит обосновать механизмы сдвигов нервной трофики в этот возрастной период. В предыдущей работе [6] были представлены данные о влиянии порадrenalина на биосинтез белка у животных разного возраста, настоящее сообщение посвящено исследованию влияния нарастающих концентраций ацетилхолина на биосинтез тотальных белков в предсердиях, правом и левом желудочках сердца крыс разного возраста. Следует отметить, что при старении в отделах сердца неравномерно изменяется активность ферментов синтеза и гидролиза ацетилхолина. У старых крыс достоверно снижается активность холинацетилтрансферазы в предсердиях, но не изменяется в желудочках. В предсердиях с возрастом снижается активность ацетилхолинэстеразы, но не изменяется активность неспецифической холинэстеразы, тогда как в желудочках сердца с возрастом снижается активность обоих ферментов [7].

М е т о д и к а

Опыты были проведены на белых крысах возраста 2, 8—10, 26—28 мес. Животных декапитировали, извлекали сердце, промывали в Krebsa — Рингера бикарбонатном буферном растворе pH 7,4 [8], делали срезы соответствующих отделов сердца. Навески срезов предсердий (40 мг) или желудочков (50 мг) помещали в стоящие на льду флаконы с тем же буфером, содержащим 0,005% прозерина. Для получения необходимого количества ткани в одном опыте использовали 24 двухмесячных, 8 взрослых и 6 старых крыс. Флаконы прикрывали пробками, через которые были проткнуты иглы для переливания крови, присоединенные к газораспределительной гребенке, пропускали в течение 3 мин газовую смесь (95% O₂, 5% CO₂) и плотно закрывали пробки и иглы. Все эти манипуляции производили в холодной комнате при температуре 4°C. Флаконы помещали в водяную баню аппарата Варбурга (37°C) и инкубировали (предсердия 30 мин, желудочки 15 мин) при встряхивании (100 встряхиваний в минуту). Затем во флаконы добавляли необходимые по ходу опыта вещества, ¹⁴C-гидролизат белка хлореллы (ЧССР, 0,5 мкКи на 1 мл пробы, ее общий объем 2 мл), вновь 3 мин пропускали газовую смесь и инкубировали предсердия 30 мин, желудочки 1 ч. Дальнейшую обработку срезов проводили по Вуд и Крал [9], используя процедуру Хидена и Ланге [10] и Тихонова и соавт. [11]. После инкубации срезы трижды промывали большими объемами холодного раствора Krebsa — Рингера и гомогенизировали в 2 мл этого раствора. 0,5 мл гомогената добавляли к 1,5 мл 0,66 н. HClO₄, центрифугировали и надосадочную жидкость сливали в мерный цилиндр. Осадок еще раз промывали 0,5 н. HClO₄, надосадочные жидкости объединяли и доводили до объема 4 мл. Радиоактивность кислоторастворимого материала в расчете на 1 мг белка осадка характеризовала величину фонда свободных меченных аминокислот в срезах. В предсердиях ее уровень колебался от 1616±100 имп/мин/мг у двухмесячных крыс до 953±96 имп/мин/мг у старых.

Оставшиеся 1,5 мл гомогената добавляли к равному объему 1 н. HClO₄ и кислоторастворимый материал отмывали дважды 0,5 н. HClO₄, один раз 0,5 н. HClO₄ при 90°C в течение 15 мин, после охлаждения один раз 0,5 н. HClO₄, один раз смесью этанол — хлороформ — эфир (3 : 2 : 1), два раза эфиром. Осадок высушивали и растворяли в 0,5 н. NaOH, нагревая на водяной бане при 50°C в течение 30 мин. В аликвотах этого раствора определяли белок и радиоактивность. Содержание белка определяли по Лоури и соавт. [12], радиоактивность проб подсчитывали на сцинтилляционном счетчике SL-30 («Интертехник», Франция), используя сцинтилляционную жидкость ЖС-8. Степень включения метки в белки выражали в единицах удельной радиоактивности, величина которой в предсердиях колебалась от 1720±88 имп/мин/мг у двухмесячных крыс до 853±82 имп/мин/мг у старых. Об изменениях интенсивности биосинтеза белков судили по изменениям величины относительной удельной радиоактивности (ОУР = удельная радиоактивность белков : удельная радиоактивность кислоторастворимого фонда). В предсердиях ее уровень колебался от 1131±0,079 у двухмесячных крыс до 0,791±0,063 у старых.

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

Проведенными опытами установлено, что ацетилхолин в определенных концентрациях приводит к активации биосинтеза белка в предсердиях (рис. 1, А). Обращает внимание, что степень активации биосинтеза белка и величина оптимальных концентраций ацетилхолина неодинаковы у животных разного возраста. Так, наибольший прирост величины ОУР у двухме-

сячных крыс происходит при концентрации ацетилхолина $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, у взрослых — при $1 \cdot 10^{-3}$ М, у старых — при $5 \cdot 10^{-4}$ М.

Срезы правого и левого желудочков инкубировали с ацетилхолином в концентрациях от $1 \cdot 10^{-8}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ М. В срезах правого желудочка максимальный прирост величины ОУР для всех возрастных групп отмечен при концентрации ацетилхолина $1 \cdot 10^{-5}$ М. У двухмесячных крыс сдвиг составляет 13% по отношению к исходному уровню, у взрослых — 7%, у старых — 21% (рис. 1, Б). Статистически достоверным является сдвиг величины ОУР только у старых животных ($P=0,05$).

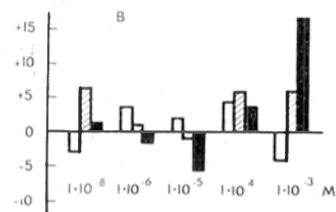
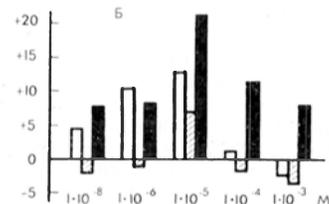
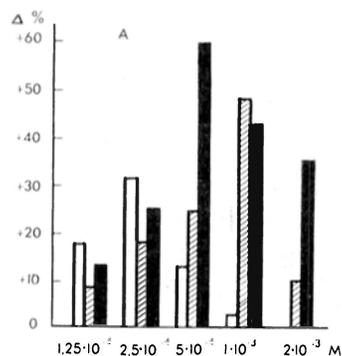


Рис. 1. Влияние различных концентраций ацетилхолина в инкубационной среде на изменения ОУР (в % к контролю) в предсердиях (А), правом (Б) и левом (В) желудочках сердца двухмесячных (светлые столбики), взрослых (заштрихованные) и старых (темные) крыс.

В срезах левого желудочка изменения величины ОУР во всех возрастных группах статистически недостоверны. Вместе с тем обращают внимания два обстоятельства. Во-первых, разнонаправленность изменений величины ОУР в срезах двухмесячных крыс и старых животных при переходе от $1 \cdot 10^{-4}$ к $1 \cdot 10^{-3}$ М ацетилхолина — у двухмесячных ОУР снижается, а у старых возрастает. Вторых, больший, хотя статистически и недостоверный, сдвиг ее у старых животных при $1 \cdot 10^{-3}$ М ацетилхолина (двухмесячные — 4%, взрослые +5%, старые +16%; рис. 1, В).

Во всех отделах сердца наиболее выраженная активация биосинтеза белка под влиянием ацетилхолина отмечена у старых крыс.

Поскольку ацетилхолин влияет на сердце, взаимодействуя с м-холинорецепторами мембраны миокардиальных волокон, можно было предположить, что его воздействие на биосинтез белка опосредовано через холинорецептор. Для выяснения этого предположения определяли влияние разных концентраций атропина на последующие эффекты ацетилхолина. Опыты были поставлены на двухмесячных крысах. Конечная концентрация ацетилхолина в инкубационной среде была $2,5 \cdot 10^{-4}$ М (при такой концентрации наблюдается максимум стимуляции биосинтеза белка в предсердиях этой возрастной группы). Предсердия 30 мин преинкубировали с атропином (конечная концентрация $2,5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ М), добавляли ацетилхолин, 14 С-гидролизат хлореллы (0,5 мкКи/мл), инкубировали 30 мин и обрабатывали, как описано в разделе «Методика».

В этих опытах под влиянием ацетилхолина величина ОУР увеличилась на 34% по отношению к контролю, а под влиянием атропина снизилась более чем на 50%. Добавление ацетилхолина на фоне атропина не изменяло величины снижения ОУР (рис. 2). Эти данные указывают на то, что атропин угнетает интенсивность биосинтеза белка в предсердиях и снимает стимулирующее действие ацетилхолина.

Оценка физиологического значения стимулирующего влияния ацетилхолина на биосинтез белка в отделах сердца может быть дана при анализе роли холинергических влияний в развитии приспособления сердца к все возрастающим нагрузкам в ходе эволюции млекопитающих. Еще в работах Х. С. Коштыянца [13], И. А. Аршавского [14], А. И. Смирнова [15] неод-

покранию высказывалось положение о том, что усиление холинергических влияний на сердце является неизменным условием повышения работоспособности сердца. Одним из косвенных доказательств влияния блуждающего нерва на процессы биосинтеза белка в сердце являются опыты Катохвила и соавт. [16], которые показали, что двусторонняя перерезка блуждающих нервов препятствует развитию гипертрофии сердца при создании стеноза аорты. Эти данные были подтверждены и уточнены Г. М. Бутенко [17], который обнаружил, что только левосторонняя ваготомия предотвращает развитие гипертрофии сердца.

Сопоставляя изменения величины ОУР в отделах сердца под влиянием ацетилхолина, можно отметить следующие закономерности: наибольшие сдвиги интенсивности биосинтеза белка происходят в предсердиях, затем по нисходящей располагаются правый и левый желудочки; предсердия реагируют на более высокие концентрации ацетилхолина, чем желудочки. Обращает внимание изменение с возрастом эффективных концентраций ацетилхолина и величины сдвига ОУР. Так, в предсердиях максимальное повышение биосинтеза белка отмечается у двухмесячных крыс при концентрации ацетилхолина $2,5 \cdot 10^{-4}$ М (прирост 32%), у взрослых — при $1 \cdot 10^{-3}$ М (прирост 48%), у старых — при $5 \cdot 10^{-4}$ М (прирост 61%). В правом желудочке максимальный прирост ОУР во всех возрастных группах наблюдается при концентрации ацетилхолина $1 \cdot 10^{-5}$ М, но только у старых животных этот прирост (+21%) статистически достоверен. Аналогичные соотношения сохраняются и в левом желудочке. Здесь стимулирующая концентрация ацетилхолина $1 \cdot 10^{-3}$ М. При этой концентрации ОУР у старых крыс повышается на 16%.

Полученные факты находятся в соответствии с положениями, высказываемыми В. В. Фролькисом о повышении в старости чувствительности тканей к гуморальным факторам [5]. Более выраженную реакцию белоксинтезирующего аппарата миокарда на ацетилхолин у старых животных можно рассматривать как приспособительный механизм, направленный на сохранение функциональной способности мышцы сердца в старости.

ЛИТЕРАТУРА

- Ильин В. С., Замосковская Г. А., Усатенко М. С. — Ж. эволюц. биохим., 1974, № 1, с. 10—15. — 2. Peakall D. V. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1967, v. 126, p. 198—201. — 3. Mastanus J. P., Woupton A. L., Whitfield J. F. et al. — J. Cell. Physiol., 1975, v. 85, p. 321—330. — 4. Парина Е. В. Возраст и обмен белков. Харьков, 1967. — 5. Фролькис В. В. Старение и биологические возможности организма. М., 1975. — 6. Верхратский Н. С. — В кн.: Геронтология и гериатрия. Ежегодник. Киев, 1977, с. 128—134. — 7. Verkhatsky N. S. — Exp. Geront., 1970, v. 5, p. 49—56. — 8. Умбрейт В. В., Буррис Р., Штауффер Д. Манометрические методы изучения тканевого обмена. М., 1951. — 9. Wool I. G., Gahl M. E. — Am. J. Physiol., 1959, v. 196, p. 961—964. — 10. Хиден Х., Ланге П. В. — Ж. эволюц. биохим., 1969, № 5, с. 145—157. — 11. Тихонов В. Х., Валеева Р. М., Мезенцев А. Н. — Укр. биохим. ж., 1973, № 2, т. 45, с. 116—121. — 12. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. et al. — J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275. — 13. Коштоянц Х. С. Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция. М., 1951. — 14. Аршавский И. А. Очерки по возрастной физиологии. М., 1967. — 15. Смирнов А. И. Роль тонуса центров блуждающих нервов в экономной форме сердечной деятельности. М., 1967. — 16. Katochvil M., Molnar A., Segny J. et al. — Bratisl. lek. Listy, 1961, v. 1, p. 129—138. — 17. Бутенко Г. М. — Пат. физиол., 1971, № 6, с. 30—34.

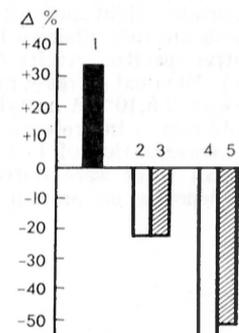


Рис. 2. Влияние атропина и ацетилхолина на изменение ОУР (в % к контролю) срезов предсердий двухмесячных крыс.

1 — ацетилхолин $2,5 \cdot 10^{-4}$ М; 2 — атропин $2,5 \cdot 10^{-8}$ М; 3 — атропин $2,5 \cdot 10^{-6}$ М + ацетилхолин $2,5 \cdot 10^{-4}$ М; 4 — атропин $5 \cdot 10^{-8}$ М; 5 — атропин $5 \cdot 10^{-6}$ М + ацетилхолин $2,5 \cdot 10^{-4}$ М.

Поступила 12/IX 1977 г.

EFFECT OF ACETYLCHOLINE ON PROTEIN BIOSYNTHESIS IN HEART OF ADULT AND OLD RATS

N. S. Verkhvatskiy

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

Effect of acetylcholine on incorporation of labelled amino acids (^{14}C hydrolysate of chlorella protein) into the free amino acid pool and total protein was studied using slices of auricles, right and left heart ventricles, obtained from 2-month, 8-10-month and 26-28-month old rats. Changes in the intensity of protein biosynthesis were estimated by following relative specific activity (RSA — protein specific activity/free amino acid pool specific activity). Maximal increase in the RSA value was found: in auricles of 2-month old rats in presence of $2.5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ acetylcholine, in adult rats — in presence of $1 \cdot 10^{-3}\text{M}$ acetylcholine and in old rats — in presence of $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ acetylcholine; in right ventricle of all age groups — at the concentration of $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ acetylcholine. In left ventricle of all age groups the changes in RSA value were statistically insignificant. Atropine blocked the stimulating effect of acetylcholine on protein biosynthesis in auricles.

УДК 612.351.1 + 616.36-006-092.9-008.9

С. Я. Давыдова, С. С. Ветчинин

СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ, АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ, ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 3',5'-АМФ И ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ ПЕЧЕНИ И ГЕПАТОМАХ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Лаборатория биохимии опухолей Онкологического научного центра АМН СССР, Москва

Обнаружено, что активность аденилатциклазы в плазматических мембранах (ПМ) гепатомы 22 и асцитной карциномы Эрлиха — опухолях высокой степени злокачественности — и внутриклеточный уровень 3', 5'-АМФ (цАМФ) в этих тканях снижены в 2,5—4 раза по сравнению с нормой. Активность фосфодиэстеразы цАМФ в ПМ во всех исследованных опухолях значительно превышала норму. В наименее злокачественной гепатоме 48 активность аденилатциклазы и уровень цАМФ мало отличались от нормы. Активность гуанилатциклазы в ПМ всех исследованных опухолей и печени опухоленосителей была близка к норме. Не найдено существенных отличий в содержании цГМФ в опухолях, за исключением гепатом 60 и 22, в которых оно превышало норму в 2 раза. Отношение уровня цАМФ и цГМФ было значительно снижено в наиболее злокачественных гепатомах. В то же время в опухолях средней степени злокачественности (гепатомы 60 и 61) это соотношение было высоким.

Имеется немало данных в пользу предположения о том, что пониженная способность к выработке 3', 5'-АМФ (цАМФ) имеет отношение к механизмам, контролирующим пролиферацию клеток. По данным ряда авторов, в опухолевых и трансформированных клетках уровень цАМФ оказывается сниженным [1, 2]. Нередко низкий уровень цАМФ сопровождается и снижением активности аденилатциклазы [3, 4]. Однако есть сведения об отсутствии различий в содержании цАМФ в нормальных и неопластических тканях [5] и даже о повышенном содержании цАМФ [6] и активности аденилатциклазы при трансформации клеток и злокачественном росте [7]. При сопоставлении изменений в содержании цАМФ и активности аденилатциклазы в процессе неопластического превращения необходимо учитывать и изменения в активности фосфодиэстеразы цАМФ. По данным многих авторов [1, 8, 9], активность фосфодиэстеразы цАМФ при митозах, в лейкозных клетках и саркомах значительно возрастает, что, по-видимому, не является характерным для всех злокачественных клеток [10, 11]. В настоящее время существенная роль в регуляторной роли циклических нуклеотидов при канцерогенезе отводится цГМФ и главным образом соотношению уровня цАМФ и цГМФ. Низкие величины этого соотношения характерны для пролиферирующих, высокие — для неразмножающихся клеток [5]. Нет сомнения

в том, что участие циклических нуклеотидов в регуляции процессов размножения клеток является чрезвычайно сложным и малоизученным механизмом.

В настоящей работе мы определяли активность аденилатциклазы, фосфодиэстеразы цАМФ, гуанилатциклазы в плазматических мембранах (ПМ) нормальной печени, гепатомах различной степени злокачественности, печени опухоленосителей, а также уровень цАМФ и цГМФ в этих тканях.

Методика

Опыты проводили на белых беспородных мышках с переносимой карциномой Эрлиха и на мышках линии СЗПА с перевиваемыми гепатомами Гельштейн различной степени злокачественности [12]. По темпу роста и степени злокачественности исследованные опухоли подразделялись на быстрорастущие, высокозлокачественные (асцитная форма гепатомы 22 и асцитная карцинома Эрлиха), средней степени злокачественности (гепатомы 60 и 61) и низкоккачественные (гепатома 48).

ПМ выделяли по методу Невилля [13] в модификации Эмметта и соавт. [14] в среде 1 мМ NaHCO₃ и 0,5 мМ CaCl₂ (при выделении ПМ из асцитных опухолей концентрацию CaCl₂ увеличивали до 2 мМ) с последующим ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте плотности сахарозы. Собирали фракцию ПМ, флотирующую в интервале между плотностями сахарозы 1,18—1,16. Чистоту выделенных ПМ проверяли по тесту ферментов-маркеров [15, 16]. Для определения активности аденилатциклазы 15—20 мкг белка ПМ инкубировали в среде следующего состава: 0,05 М трис-НСI-буфер рН 7,2, 2 мМ MgCl₂, 0,5 мМ АТФ, 50 мМ NaF, 0,05 мкКи ¹⁴C-АТФ; общий объем 20 мкл. Определение активности фосфодиэстеразы цАМФ производили в той же среде, но вместо ¹⁴C-АТФ вносили 0,025 мкКи ³H-цАМФ. Активность гуанилатциклазы определяли в среде, содержащей 15—20 мкг белка ПМ, 0,05 М трис-НСI-буфер рН 7,2, 2 мМ MgCl₂, 0,5 мМ ГТФ и 0,02 мкКи ³H-ГТФ. Все пробы инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали кипячением на водяной бане. Пробы охлаждали и центрифугировали на холоду в течение 10 мин при 2000 g. Из надосадочной жидкости отбирали по 2 мкл для хроматографирования. Нуклеотиды разделяли на силуфоловых пластинках UV-254 (фирма «Kavalier», Чехословакия) по методу [17]. Проводили восходящую хроматографию последовательно в двух системах растворителей: бутанол — ацетон — 11 н. NH₄OH в отношении 8 : 2 : 2 и в системе тех же компонентов, но в соотношении соответственно 8 : 2 : 5 в течение 1 1/2 ч при 20°C. В неочищенных ферментных препаратах, помимо цАМФ и цГМФ, образуются и другие продукты превращения АТФ — АДФ, АМФ, аденозин и аденин и ГТФ — ГДФ, ГМФ, гуанин и гуанозин. Все указанные соединения обнаруживали с помощью ультрахромоскопа в виде пятен, вырезали и помещали во флаконы, содержащие 3 мл сцинтилляционной смеси (200 мг 1,4-ди 2,5-фенилноксазалина и 4 г 2,5-дифенилноксазола в 1 л толуола). При определении радиоактивности по ³H вырезанные пятна измельчали и элюировали 0,5 мл н. HCl в течение 15 мин при 65—70°C. 0,3 мл элюата вносили в 2 мл сцинтилляционной смеси того же состава, но содержащего, кроме толуола, тритон X-100 в соотношении 2 : 1. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике «Магк 11» (фирма «Nucleur Chicago», США). Процент радиоактивности, обнаруженной в пятне свидетеля цАМФ или цГМФ, от общей радиоактивности всех вырезанных пятен, принятых за 100%, характеризовал скорость образования цАМФ или цГМФ, т.е. активность аденилатциклазы или гуанилатциклазы. Об активности фосфодиэстеразы цАМФ судили по убыли радиоактивности из пятна свидетеля цАМФ. Внутриклеточное содержание цАМФ и цГМФ определяли при помощи наборов cyclic AMP assay Kit (фирма «Amersham»,

Таблица 1
Активность аденилатциклазы (в % от общей радиоактивности) в ПМ нормальной печени, печени опухоленосителей и опухолях

Печень СЗПА мышей Эрлиха	Печень мышей с переносимыми опухолями			Опухоль			Печень беспородных мышей		Мыши с карциномой Эрлиха	
	48	61	60	22	61	60	22	печень	карцинома	
2,7±0,31	2,9±0,42	3,5±0,41	2,9±0,52	2,7±0,45	4,4±0,56	4,5±0,39	1,1±0,12	3,5±0,69	3,7±1,1	0,86±0,13

Англия). Тканевые экстракты готовили по методу Джильмана [18]. 1—1,5 г ткани замораживали в жидком азоте, растирали в ступке, экстрагировали 5% ТХУ, осадок отделяли центрифугированием, дважды промывали 5% ТХУ. Промывные жидкости объединяли с основным экстрактом. К общему объему добавляли 0,5 н. HCl до конечной концентрации 0,1 н. HCl. Для удаления следов ТХУ проводили пятикратную экстракцию 5 объемами водонасыщенного эфира с последующей нейтрализацией 2 М трис-HCl-буфером рН 7,4. Содержание цГМФ определяли при помощи соответствующих стандартных наборов *sus-cis GMP assay Kit* (фирма «Amerham», Англия).

Т а б л и ц а 2

Содержание цАМФ, цГМФ и соотношение цАМФ/цГМФ в нормальной печени, печени опухоленосителей и опухолях (первая цифра — нмоль на 1 мг сырого веса, вторая цифра — нмоль на 1 мг белка)

Объект исследования	цАМФ	цГМФ	цАМФ/цГМФ (в среднем)
Печень мышей СЗНА	0,25/3,6	0,017/0,24	14,8
Печень мышей с перевитой гепатомой:			
48	0,35/5,0	0,018/0,26	19,3
61	0,35/5,0	0,021/0,30	16,6
60	0,31/4,4	0,023/0,33	13,3
22	0,39/5,5	0,023/0,33	16,7
Гепатома:			
48	0,29/4,1	0,016/0,21	18,8
61	0,63/9,0	0,016/0,23	39,2
60	0,71/10,0	0,030/0,40	24,3
22	0,10/1,4	0,037/0,40	3,10
Печень беспородных мышей	0,15/2,5	0,013/0,24	10,9
Печень мышей с карциномой Эрлиха	0,30/4,3	0,013/0,21	21,7
Карцинома Эрлиха	0,07/1,0	0,012/0,20	5,4

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные, указывающие на то, что активность аденилатциклазы в ПМ низкокочаественной гепатомы 48 практически не отличается от нормы. В гепатомах средней степени злокачественности (60 и 61) и в высококочаественных (гепатома 22 и карцинома Эрлиха) активность фермента изменялась, причем в ПМ гепатом 61 и 60 она возрастала в 1,5 раза, а в высококочаественных опухолях, напротив, снижалась в 2,5—4 раза.

В печени опухоленосителей (за исключением некоторого повышения в печени мышей с гепатомой 61) изменений в активности аденилатциклазы обнаружено не было.

Из табл. 2 видно, что содержание цАМФ в гепатоме 48 лишь незначительно превышает норму, тогда как в гепатоме 22 и в карциноме Эрлиха количество этого нуклеотида снижено в 2,5 раза.

Таким образом, как активность аденилатциклазы, так и уровень цАМФ в исследованных опухолях изменялся одинаково. В печени мышей — носителей всех исследованных гепатом — уровень цАМФ возрастал в 1,3—1,5 раза и в 2 раза он был выше в печени мышей — носителей карциномы Эрлиха. Такие же результаты получены в работе Броуна и соавт. [7] на печени крыс с перевитой гепатомой Мориса, причем активностью аденилатциклазы повышалась с увеличением скорости роста опухоли.

Активность гуанилатциклазы в ПМ всех исследованных гепатом, карциномы Эрлиха и печени опухоленосителей мало отличалась от нормы, колебания в ту или другую сторону не превышали 10—30% (табл. 3).

Существенных отличий в количестве цГМФ в исследованных опухолях, за исключением гепатом 60 и 22, в которых этот уровень был в 2 раза выше, также не было обнаружено (см. табл. 2). Содержание цГМФ в печени всех мышей с привитыми гепатомами было несколько увеличено. Отсутствие корреляции между скоростью роста опухолей и уровнем цГМФ в них находили и другие авторы [2]. Результаты определения фосфодиэстеразы цАМФ в ПМ

всех исследованных тканей представлены в табл. 4. Из табл. 4 видно, что во всех исследованных опухолях активность фосфодиэстеразы цАМФ превышает норму в 1,5—2,5 раза, а в гепатоме 22 она была выше более чем в 3 раза. В ПМ печени мышей с привитыми гепатомами активность фосфодиэстеразы также была выше приблизительно в 1,5 раза.

Отношение цАМФ/цГМФ резко (в 4,7—2,0 раза) снижалось в гепатоме 22 и карциноме Эрлиха. Для гепатом 60 и 61 это соотношение превышало норму. Для гепатомы 48 и печени опухоленосителей в соотношении уровня циклических нуклеотидов закономерных изменений не обнаружено (см. табл. 2).

Обнаруженное нами значительное снижение активности аденилатциклазы и уровня цАМФ в наиболее злокачественных гепатоме 22 и карциноме Эрлиха свидетельствует о существенном дефекте аденилатциклазной системы в злокачественных опухолях. Увеличение активности аденилатциклазы в ПМ и количества цАМФ в гепатомах средней степени злокачественности (60 и 61), вероятно, связано с какими-то биологическими особенностями роста и его регуляции в этих опухолях.

Известно, что уровень цАМФ изменяется в зависимости от активности фосфодиэстеразы цАМФ. Мы наблюдали значительное повышение активности этого фермента во всех исследованных опухолях, но особенно в гепатоме 22. Подобные же результаты были получены и в других работах [8, 9]. Следует осо-

Таблица 3
Активность гуанилатциклазы (в % от общей радиоактивности) в ПМ нормальной печени, печени опухоленосителей и опухолях

Печень мышей СЗНА	Печень мышей с привитыми опухолями			Опухоль			Мыши с карциномой Эрлиха			
	48	61	60	22	48	61	60	22	печень	карцинома
8,0±0,59	7,6±1,72	8,2±1,50	8,7±1,15	7,6±1,24	7,1±1,42	10,4±2,57	10,5±2,49	6,8±1,18	12,3*	13,6*

* Средние данные 3 опытов.

Таблица 4
Активность фосфодиэстеразы цАМФ (в % от общей радиоактивности) в ПМ нормальной печени, печени опухоленосителей и опухолях

Печень мышей СЗНА	Печень мышей с привитыми опухолями			Опухоль			Печень беспородных мышей		Мыши с карциномой Эрлиха		
	48	61	60	22	48	61	60	22	печень	карцинома	
14,5±3,27	21,4±6,20	24,7±7,90	20,7±5,70	29,4±6,30	38,0±2,97	37,7±5,60	22,9±0,43	48,1±7,33	16,8±3,60	12,0*	30,0*

* Средние данные 3 опытов.

бо подчеркнуть, что в отличие от аденилатциклазы фосфодиэстераза и гуанилатциклаза локализованы главным образом в растворимой клеточной фракции и лишь меньшая их часть связана с мембранами. В нашу же задачу входило исследование только мембраносвязанных ферментов. По данным Родса и соавт. [10], активность фосфодиэстеразы цАМФ в растворимой фракции гепатом с различной скоростью роста снижалась на 60 % по сравнению с нормальной печенью, а в печени животных с опухолями она была снижена только при быстрорастущих гепатомах.

В активности мембраносвязанной гуанилатциклазы мы не обнаружили существенных отличий между показателями для ПМ печени нормальных крыс, опухоленосителей и самих опухолей. Согласно данным Криса и соавт. [19], для печени крыс отношение мембраносвязанной и растворимой гуанилатциклазы равно 0,24, а для гепатом Морриса — 1. Исходя из этих соотношений, можно предположить, что в процессе канцерогенеза изменяется главным образом активность растворимой гуанилатциклазы.

Мы нашли, что отношение цАМФ/цГМФ было снижено в наиболее злокачественных опухолях, в то же время в опухолях средней степени злокачественности оно превышало норму, что пока объяснить не представляется возможным.

Как мы уже отмечали при изложении отдельных результатов нашего исследования, в печени мышей-опухоленосителей найдены некоторые изменения в активности ферментов и в содержании циклических нуклеотидов, которые чаще всего не были сильно выражены и в отдельных случаях были направлены в ту же сторону, что и в опухолях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burger M. M., Bombic B. M., Breckenridge B. McL. et al.— Nature, New Biol., 1954, v. 239, p. 161.— 2. Matusic R. Y., Nief R.— J. nat. Cancer Inst. (Wash.), 1976, v. 56, p. 659.— 3. Васильев В. Ю., Гуляев Н. Н., Северин Е. С.— Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1976, т. 20, с. 306.— 4. Moens W., Vokaer A., Kraw R.— Proc. nat. Acad. Sci., 1975, v. 72, p. 1063.— 5. Shields R.— Nature, 1974, v. 252, p. 11.— 6. Chajoth R., Epstein S. H., Field J. B.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1972, v. 49, p. 1663.— 7. Brown H. D., Swaray K., Chattopadhyay H. D. et al.— Cancer Res., 1970, v. 30, p. 123.— 8. Абакумова О. Ю., Федоров Н. А.— Вопр. мед. химии, 1970, № 1, с. 3.— 9. Robert K., Reinyug H.— Cancer Res., 1975, v. 35, p. 2440.— 10. Rhoads A. R., Morris H. P., West W. L.— Ibid., 1972, v. 32, p. 2651.— 11. Lynch T. Y., Tailand E., Cheung J. W.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1975, v. 65, p. 1115.— 12. Гельштейн В. И.— Цитология, 1971, № 1, с. 3.— 13. Neville D. M.— J. Biophys. Biochem. Cytol., 1960, v. 8, p. 413.— 14. Emmelot P., Vos C. Y. et al.— Biochim. biophys. Acta, 1964, v. 90, p. 126.— 15. Шапот В. С., Давыдова С. Я., Стрелкова Л. Б.— В кн.: Структура и функция биомембран. М., 1971, с. 78.— 16. Давыдова С. Я.— Биохимия, 1968, т. 33, с. 685.— 17. Бериташвили Д. Р., Кафгани К. А.— Вопр. мед. химии, 1975, № 3, с. 322.— 18. Gilman A. G.— Proc. nat. Acad. Sci., 1970, v. 67, p. 305.— 19. Criss W., Murad F., Kimura M. et al.— Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 445, p. 500.

Поступила 12/IX 1977 г.

CONTENT OF CYCLIC NUCLEOTIDES, ACTIVITY OF ADENYLATE CYCLASE, 3',5'-AMP PHOSPHODIESTERASE AND OF GUANYLATE CYCLASE IN PLASMATIC MEMBRANES OF LIVER TISSUE AND HEPATOMAS WITH VARIOUS LEVEL OF MALIGNANCY

S. Ya. Davydova, S. S. Vetchinin

Laboratory of Tumor Biochemistry, Oncologic Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Adenylate cyclase activity as well as intracellular content of sAMP were decreased 2.5-4-fold, as compared with normal state, in plasmatic membranes (PM) of hepatoma 22 and of Ehrlich ascites carcinoma — the tumors characterized by high level of malignancy. Activity of cAMP phosphodiesterase exceeded distinctly the normal value in all the tumors studied.

In less malignant hepatoma 48 the adenylate cyclase activity and content of cAMP were similar to those found in normal liver cells. The guanylate cyclase activity did not differ markedly from values found in normal liver cells in PM of all the tumors studied and in liver tissue of the tumor-bearing animals. Distinct alterations were not found in content of cGMP in the tumors, except of hepatomas 60 and 22, in which the nucleotide level exceeded 2-fold the normal value. The ratio cAMP/cGMP was decreased in the most malignant tumors. At the same time, the ratio was distinctly elevated in tumors with the middle level of malignancy (hepatomas 60 and 61).

УДК 616.127-005.4-055.1-053.86-037:[616.153:577.15

*Е. Н. Герасимова, И. С. Глазунов, Е. А. Бодрова,
С. Н. Сучкова, В. П. Зыкова, Г. И. Бурлуцкий,
Н. В. Перова, Н. П. Чернышова, А. А. Задоя*

4 ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ГОРМОНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ФАКТОРЫ РИСКА ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У МУЖЧИН В ВОЗРАСТЕ 40—59 ЛЕТ

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Содержание тестостерона, эстрадиола, кортизола, общего холестерина (ХС), триглицеридов, ХС α -липопротеидов (α -ХС) определялось в плазме крови 124 мужчин в возрасте 40—59 лет, вызванных для эпидемиологического обследования (репрезентативная подвыборка). Кроме того, у 112 из них определен инсулин и у 102 — гормон роста. Дисбаланс стероидных гормонов обнаружен у мужчин с одним фактором риска ишемической болезни сердца (ИБС) — снижением уровня α -ХС. Наличие двух факторов риска ИБС — гипертриглицеридемии и снижения уровня α -ХС — было связано не только с дисбалансом стероидных гормонов, но и с нарушением соотношения белковых гормонов — инсулина и гормона роста.

Увеличение заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, в частности от ишемической болезни сердца (ИБС), в век резкого изменения окружающей среды, бурного развития техники, снижения физической активности людей позволяет предполагать наличие нарушений в системе нейрогуморальной регуляции. Синтез и секреция гормонов, осуществляющих регуляцию обменных процессов на молекулярном уровне, зависят как от адекватности реакции гипоталамуса и гипофиза, так и от функционального состояния желез внутренней секреции.

В связи с этим принципиальное значение имеет разработка методологических подходов, позволяющих обнаружить в плазме крови незначительные изменения физиологических концентраций гормонов и выяснить роль этих изменений в развитии повышения количества атерогенных (пре- β - и β -) и снижении содержания антиатерогенных (α -) липопротеидов (ЛП). Вышеуказанные изменения в обмене ЛП являются факторами риска ИБС [1—12]. Для выяснения этих вопросов необходимо одновременное определение в плазме крови количества ряда гормонов, зависящего от их синтеза и секреции, а также количества общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ) и ХС α -липопротеидов (α -ХС), а также отношения суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС. Повышение этого соотношения свидетельствует о нарушении обмена ЛП с перераспределением ХС и накоплением его в пре- β - и β -ЛП, в состав которых входит апопротеин группы В, обладающий способностью связываться с мукополисахаридами и эластином сосудистой стенки. Последнее приводит к пролиферации гладких мышечных клеток, что в соответствии с современными представлениями рассматривается как начальный этап развития атеросклероза.

ТГ в основном транспортируются пре- β -ЛП, поэтому увеличение содержания ТГ в плазме крови отражает увеличение синтеза в печени пре- β -ЛП.

По современным представлениям [13], катаболизм пре- β -ЛП, транспортирующих ТГ, имеет двухступенчатый характер. Первичный гидролиз ТГ в непосредственной близости к эндотелию капилляров под влиянием ли-

попротеидлипазы (ЛПЛ) приводит к образованию из пре- β -ЛП более мелких частиц — промежуточных ЛП. Второй этап — катаболизм этих ЛП в печени с участием печеночной ЛПЛ. Промежуточные ЛП по сравнению с основной фракцией пре- β -ЛП содержат меньше ТГ и апопротенинов группы С и относительно больше ХС и апопротенинов группы В, они легко проникают в сосудистую стенку и откладываются в ней [14].

В противоположность этому α -ЛП, содержащие другие апопротенины— A_1 и A_2 , являются единственным классом ЛП, который обладает способностью удалять ХС с мембран гладких мышечных клеток сосудов и транспортировать его в печень для последующего удаления из организма [15, 7].

Особое значение имеет определение этих показателей у мужчин в возрасте 40—59 лет, у которых по сравнению с женщинами обнаружена более высокая концентрация в плазме ХС атерогенных ЛП, более низкое содержание α -ХС, а частота заболеваемости ИБС и смертности от инфаркта миокарда превышает соответственно в 2,5 и в 7 раз эти показатели у женщин того же возраста [16, 17].

Целесообразность одновременного определения концентрации тестостерона, эстрадиола, кортизола, гормона роста и инсулина обусловлена результатами ряда экспериментальных и клинических работ, показавших, что каждый из гормонов влияет на обмен ЛП [18—21]. Изменения в секреции вышеуказанных гормонов были обнаружены у людей и экспериментальных животных при эмоциональных стрессах, стимуляции вентромедиальных ядер гипоталамуса, физических тренировках и гипофизэктомии [18, 22, 23]. Наряду с этим известно, что секреция и обмен различных гормонов тесно связаны между собой. Так, у мужчин в физиологических условиях эстрогены, циркулирующие в плазме крови, образуются не только в семенниках, но и в процессе превращения тестостерона в периферических тканях — более 50% [24, 25].

Количество гормона роста в плазме крови составляет у мужчин 0,27 нг/мл, а у женщины 4,91 нг/мл [26]. Эстрогены увеличивают секрецию гормона роста [27, 28]. В свою очередь гормон роста изменяет активность β -клеток и секреции инсулина [26].

В предыдущих наших исследованиях было показано, что снижение уровня тестостерона и эстрадиола и повышение количества кортизола в плазме крови сопровождаются снижением уровня α -ХС и увеличением содержания ТГ в плазме крови мужчин в возрасте 40—59 лет. Однако эти исследования были проведены всего у 64 человек, а количество инсулина и гормона роста не определялось [29].

Целью настоящего исследования были определение содержания тестостерона, эстрадиола, кортизола, инсулина и гормона роста в плазме крови мужчин в возрасте 40—59 лет и сопоставление концентрации этих гормонов с содержанием общего холестерина, триглицеридов, α -ХС и с отношением суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС.

М е т о д и к а

Обследована репрезентативная выборка мужчин в возрасте 40—49 лет, проживающих в одном из административных районов Москвы, в количестве 186 человек с охватом обследования около 70%. Содержание тестостерона, эстрадиола, кортизола, ХС, ТГ и α -ХС определено у 124 мужчин, инсулина — у 112 и гормона роста — у 102 человек.

Кровь брали утром из локтевой вены после 12-часового голодания. Плазма хранилась при -20°C . Тестостерон, эстрадиол, кортизол, инсулин и гормон роста в плазме крови определяли радиоиммунологическим методом конкурентного торможения с помощью коммерческих стандартных наборов, выпускаемых фирмой «Sogin». Полученные средние величины содержания гормона в плазме крови соответствовали данным литературы [18, 26, 30, 31].

ХС и ТГ определяли на автоанализаторе АА-11 фирмы «Техникоп». Качество липидных исследований контролировали с использованием получаемых в центре по стандартизации в Атланте (СНПА) сывороточных пулов с низким, средним и высоким уровнем ХС и ТГ, результаты анализа которых не превышали контрольные лимиты $x \pm 2\sigma$. Превышение уровней, соответствующих верхним 10% точкам распределения ХС и ТГ в популяции,

составляющее 276 мг% для ХС и 192 мг% для ТГ, рассматривалось как гиперлиппротеидемия.

Определение α -ХС проводилось в супернатанте после осаждения пре- β - и β -ЛП гепарином в присутствии ионов марганца. Для измерения величины отношения суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС мы использовали отношение $\frac{\text{общий ХС} - \alpha\text{-ХС}}{\alpha\text{-ХС}}$, которое основано на прямом определении общего ХС плазмы и α -ХС.

Измеряли также количество аполиппротеидов [32] и ТГ в пре- β -ЛП, выделенных препаративным ультрацентрифугированием в плотности раствора NaCl $d=1,006$ г/мл [33] из плазмы крови 19 мужчин с нормальным и повышенным уровнем ТГ в плазме.

Результаты и обсуждение

Проведено сопоставление содержания гормонов и липидов в плазме крови мужчин 2 возрастных групп—40—49 и 50—59 лет. Результаты его представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, на данной подвыборке не было обнаружено достоверных различий ни в одном показателе, кроме содержания кортизола у мужчин в возрасте 40—49 лет по сравнению с возрастной группой 50—59 лет. Поэтому в дальнейшем анализ результатов проводился для всей возрастной группы 40—59 лет и результаты представлены в соответствии с количеством тестостерона, так как в предыдущих наших исследованиях, проведенных у 227 мужчин в возрасте 40—59 лет (нерепрезентативная подвыборка), нарушения в обмене липидов и липопротеидов были обнаружены у лиц с более низким содержанием в плазме крови этого гормона.

В качестве границ концентрации тестостерона использованы низкие и верхние 25 % квартили — значения вариант, делящих вариационный ряд на 4 части, как и в предыдущей работе. В соответствии с этим группа обследованных из 124 человек была разделена на 3 группы: с более низким (1-я группа), средним (2-я группа) и более высоким (3-я группа) количеством тестостерона. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, при наиболее выраженных различиях в количестве тестостерона в плазме крови у мужчин 1-й и 3-й групп имело место и изменение концентрации двух других стероидных гормонов — эстрадиола и кортизола. Снижение уровня тестостерона в 2,2 раза в 1-й группе по сравнению с 3-й группой сопровождалось тенденцией к уменьшению содержания эстрадиола и увеличением соотношения эстрадиол/тестостерон, а также увеличением содержания кортизола. Статистически значимых различий в количестве белковых гормонов — инсулина и гормона роста — не было обнаружено.

При сравнении содержания липидов в этих группах оказалось, что в 1-й группе по сравнению с 3-й группой при отсутствии изменений в содержании общего ХС уровень α -ХС был снижен на 10 мг %, а отношение суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС ($\frac{\text{общий ХС} - \alpha\text{-ХС}}{\alpha\text{-ХС}}$) имело тенденцию к повышению. Концентрация ТГ составляла соответственно $162,8 \pm 16,33$ мг % в 1-й группе и $142,6 \pm 33,6$ мг % в 3-й, но это различие не было статистически значимо.

Расчет коэффициента корреляции Пирсона между концентрацией в плазме α -ХС и ТГ показал, что между этими показателями была обратная корреляционная зависимость, которая составляла для всей группы в целом $r = -0,39$ ($P < 0,01$), а для 1, 2, и 3-й групп — соответственно $r = -0,43$, $r = -0,33$ и $r = -0,43$ ($P < 0,02$).

В дальнейшем мы считали целесообразным выделить в каждой группе лиц с гипертриглицеридемией (подгруппа б) и с нормальным содержанием ТГ (подгруппа а) и сравнить в этих подгруппах количество стероидных гормонов, а также инсулина и гормона роста, циркулирующих в плазме крови. Из анализа были исключены 4 человека с чистой гиперхолестеринемией. Результаты исследования представлены в табл. 3. Как видно из табл. 3,

Т а б л и ц а 1

Содержание гормонов и липидов в плазме крови мужчин в возрасте 40—49 и 50—59 лет

Возраст обследованных, годы	Число обследованных	Тестостерон	Эстрадиол	$\frac{\text{Эстрадиол}}{\text{Тестостерон}} \times 10^3$	Кортизол, мкг%	Гормон роста, нг/мл	Инсулин, мЕ/мл	ХС	ТГ	α -ХС	$\frac{\text{Общий ХС} - \alpha\text{-ХС}}{\alpha\text{-ХС}}$
		нг%						мг%			
40—49	58	558±28	5,63±0,35	11±0,8	15,54±0,97	1,01±0,25	8,99±0,90	218±5,7	143,8±20,6	49,1±1,77	3,73±0,20
50—59	66	496±17	5,55±0,41	12±0,8	18,23±0,93	1,02±0,19	8,42±0,74	224±4,9	144,9±10,85	47,06±1,93	4,32±0,31
40—59	124	525±16	5,59±0,27	11±0,6	16,98±0,68	1,014±0,15	8,66±0,57	221,3±3,72	144,42±11,15	48,00±1,32	4,044±0,189

Т а б л и ц а 2

Содержание гормонов и липидов у мужчин в возрасте 40—59 лет при различной концентрации тестостерона в плазме крови

Группа обследованных	Число обследованных	Тестостерон	Эстрадиол	$\frac{\text{Эстрадиол}}{\text{Тестостерон}} \times 10^3$	Кортизол, мкг%	Гормон роста, нг/мл	Инсулин, мЕ/мл	ХС	ТГ	α -ХС	$\frac{\text{Общий ХС} - \alpha\text{-ХС}}{\alpha\text{-ХС}}$
		нг%						мг%			
1-я	31	345,6±9,45	4,65±0,44	13,47±1,2	19,02±1,05	1,34±0,36	9,6±1,07	217,9±7,68	162,8±16,23	41,74±1,66	4,45±0,27
2-я	61	496,5±6,19	5,8±0,36	11,91±0,78	18,35±1,02	0,80±0,13	8,62±0,86	225,3±5,22	136,8±12,14	48,9±1,74	4,07±0,32
3-я	32	753,59±32,8	6,14±0,64	8,62±1,06	12,63±1,15	0,70±0,21	7,84±1,02	217,65±7,63	142,6±33,67	51,8±3,34	3,66±0,31
P_{1-3}			<0,1; >0,05	<0,01	<0,01					<0,01	<0,1, >0,05

в 1-й группе гипертриглицеридемия была у 9 из 28 человек, во 2-й — у 11 из 60, в 3-й — у 4 из 32, т. е. частота ее была 32% при более низком содержании тестостерона и 12% при более высоком содержании.

При наличии в плазме крови у мужчин гипертриглицеридемии имели место снижение уровня α -ХС и повышение отношения суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС по сравнению с лицами, у которых содержание ТГ было в пределах нормы.

При сопоставлении количества гормонов и их соотношения у мужчин с гипертриглицеридемией (подгруппа б) и у лиц с нормальным количеством ТГ (подгруппа а) в 1-й и 3-й группах, которые резко отличались по количеству тестостерона, выявлены изменения и в количестве других гормонов.

У мужчин с гипертриглицеридемией (подгруппа 1б) по сравнению с лицами с нормальным уровнем ТГ (подгруппа 1а) были обнаружены тенденция к снижению количества эстрадиола и снижение соотношения эстрадиол/тестостерон при одном и том же низком уровне тестостерона. Наряду с этим имела тенденция к увеличению количества инсулина и снижению уровня гормона роста.

Следовательно, в подгруппе 1б у мужчин с низким уровнем тестостерона при гипертриглицеридемии, со снижением содержания α -ХС и повышением отношения суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС имело место изменение в количестве не только стероидных гормонов, но и гормонов белковой структуры — инсулина и гормона роста.

В 3-й группе у мужчин в подгруппе б при гипертриглицеридемии и снижении содержания α -ХС были снижены количество тестостерона, эстрадиола и соотношение эстрадиол/тестостерон по сравнению с таковыми у лиц, у которых количество ТГ было в пределах нормы (подгруппа а). При этом количество кортизола составляло $17,38 \pm 4,4$ мкг% в подгруппе 3б и $12,0 \pm 1,2$ мкг% в подгруппе 3а, а гормона роста — $0,4 \pm 0,16$ и $0,76 \pm$

Т а б л и ц а 3
Содержание гормонов и липидов в плазме крови мужчин при различной концентрации ТГ

Группа и подгруппа обследованных	Число набл.-дней	Тестостерон нг%		Эстрадиол нг%	Эстрадиол/ Тестостерон $\times 10^3$	Кортизол, мкг%	Гормон роста, нг/мл	Инсулин, мЕ/мл	ХС	ТГ мг%	α -ХС	
		Общий ХС— α -ХС	α -ХС									
1-я: а б Р а-б	19	$343,7 \pm 13,1$	$5,2 \pm 0,4$	$15,2 \pm 1,09$	$19,1 \pm 1,25$	$1,58 \pm 0,53$	$7,71 \pm 1,42$	$200,5 \pm 7,6$	$115,7 \pm 8,3$	$44,1 \pm 2,3$	$3,7 \pm 0,24$	
	9	$353 \pm 15,5$	$3,3 \pm 0,89$ $< 0,1, > 0,05$	$8,97 \pm 2,2$ $< 0,02$	$16,9 \pm 2,23$	$0,51 \pm 0,12$ $< 0,1, > 0,05$	$12,1 \pm 1,72$	$237,8 \pm 15,8$	$279,7 \pm 25,8$ $< 0,001$	$36,0 \pm 2,2$ $< 0,02$	$5,8 \pm 0,55$ $< 0,01$	
2-я: а б Р а-б	49	$500,4 \pm 7,1$	$6,1 \pm 0,38$	$12,49 \pm 0,83$	$18,8 \pm 1,18$	$0,80 \pm 0,16$	$7,95 \pm 0,93$	$214,4 \pm 4,7$	$104,9 \pm 7,5$	$50,4 \pm 1,91$	$3,51 \pm 0,18$	
	11	$480,5 \pm 13$	$4,8 \pm 0,9$	$10,28 \pm 2,0$	$16,3 \pm 2,3$	$0,84 \pm 0,24$	$10,6 \pm 2,1$	$267,8 \pm 12,1$	$279,4 \pm 35,0$ $< 0,001$	$41,6 \pm 4,1$ $< 0,1, > 0,05$	$6,6 \pm 1,4$ $< 0,05$	
3-я: а б Р а-б	28	$773,7 \pm 37,6$	$6,7 \pm 0,71$	$9,4 \pm 1,3$	$12,0 \pm 1,2$	$0,76 \pm 0,25$	$7,8 \pm 1,1$	$212,7 \pm 8,5$	$95,6 \pm 7,7$	$54,8 \pm 3,6$	$3,2 \pm 0,25$	
	4	$641,25 \pm 11,25$ $< 0,01$	$2,8 \pm 0,66$ $< 0,01$	$4,0 \pm 0,01$ $< 0,05$	$17,38 \pm 4,4$	$0,403 \pm 0,16$	$7,9 \pm 2,43$	$238,0 \pm 13,26$	$477,0 \pm 18,32$ $< 0,001$	$31,0 \pm 3,46$ $< 0,01$	$6,86 \pm 0,65$ $< 0,01$	

$\pm 0,25$ нг/мл соответственно. Однако из-за небольшого числа лиц в подгруппе 3б различия не были статистически значимы. Соотношение инсулин/гормон роста в подгруппе 3б составило 19,7, а в подгруппе 3а — только 10,2, т. е. при наличии гипертриглицеридемии имело место различие в содержании гормонов не только стероидной природы, но и белковой с преобладанием инсулина.

Таким образом, из 32 мужчин в 3-й группе (с высоким содержанием тестостерона) только у 4 человек (подгруппа б), у которых имел место дисбаланс гормонов как стероидной, так и белковой природы, были выявлены два фактора риска ИБС — гипертриглицеридемия и снижение содержания α -ХС — наряду с увеличением соотношения суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС.

Исследование белково-липидного состава пре- β -ЛП показало, что при гипертриглицеридемии у 4 мужчин подгруппы 1б среднее отношение ТГ к транспортирующему их апопротеину группы В составляет $40,8 \pm 13,1$, тогда как при гипертриглицеридемии у 5 мужчин подгруппы 3б — лишь $14,1 \pm 2,5$, т. е. при низком содержании тестостерона наблюдалась тенденция к снижению соотношения ТГ/апопротеин группы В ($0,05 < P < 0,1$). Это свидетельствовало о накоплении в плазме крови крупных, обогащенных ТГ липопротеидных частиц — наиболее легких подфракций пре- β -ЛП, не подвергшихся еще липопротеидлиполизу. Подтверждением этого является увеличение среднего отношения апопротеинов С к апопротеину В в пре- β -ЛП у мужчин из подгруппы 1б ($3,0 \pm 0,6$) по сравнению с величинами этого соотношения у мужчин из остальных подгрупп; 3б ($1,0 \pm 0,15$, $n=5$, $P < 0,02$), 1а ($1,2 \pm 0,6$, $n=3$, $0,05 < P < 0,1$) и 3а ($1,2 \pm 0,15$, $n=7$, $P < 0,05$).

У большинства лиц 3-й группы (88 %) при высоком уровне тестостерона количество ТГ было наименьшим, а α -ХС — наибольшим по сравнению с таковыми у остальных обследованных (табл. 3). При этом отношение суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС было в этой группе наименьшим и составило $3,2 \pm 0,25$.

Отсутствие возрастных изменений в содержании липидов и гормонов в плазме крови мужчин обследуемой подвыборки явилось основанием для сопоставления этих показателей у всех 124 человек в возрасте 40—59 лет. При анализе полученных данных в соответствии с количеством тестостерона выявлены различия и в количестве других стероидных гормонов.

В содержании белковых гормонов — инсулина и гормона роста — в этих группах различий обнаружено не было.

При выявленных различиях в количестве стероидных гормонов в 1-й группе по сравнению с 3-й имели место и изменения в содержании липидов: количество α -ХС было снижено на 10 мг %, отношение суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС имело тенденцию к увеличению (см. табл. 2). В связи с этим представляет интерес обсуждение вопросов, касающихся возможных причин изменений в количестве стероидных гормонов, циркулирующих в плазме крови у мужчин в возрасте 40—59 лет, и механизмов влияния этих изменений на обмен липидов.

Снижение в плазме крови мужчин 1-й группы содержания тестостерона и эстрадиола является следствием снижения их секреции, так как известно, что 90 % тестостерона и 50 % эстрогенов, циркулирующих в плазме крови у мужчин, образуются в семенниках. Увеличение при этом соотношения эстрадиол/тестостерон свидетельствует в основном об увеличении превращения тестостерона в эстрадиол, так как 50 % эстрогенов образуются в результате превращения андрогенов в периферических тканях.

В противоположность этому в 3-й группе при более высокой концентрации тестостерона была обнаружена тенденция к увеличению количества эстрадиола, что дает основание считать, что образование и секреция этих гормонов были большими, чем у лиц 1-й группы. Снижение при этом соотношения эстрадиол/тестостерон показывает, что превращение тестостерона в эстрадиол было снижено.

Таким образом, у мужчин 1-й группы по сравнению с обследованными 3-й группы наряду с отсутствием изменений в количестве инсулина и гормона роста имели место увеличение секреции кортизола, а также различие как в секреции половых гормонов — тестостерона и эстрадиола, так и в их метаболизме.

Данные литературы, касающиеся увеличения связывающей способности тестостерон-эстрадиол-связывающего глобулина с тестостероном при повышении количества эстрогенов [34], и обнаруженное нами увеличение соотношения эстрадиол/тестостерон позволяют полагать, что наряду со снижением количества общего тестостерона в 1-й группе, по-видимому, имело место и уменьшение количества биологически активного гормона.

Половые гормоны в плазме крови оказывают разнонаправленное действие на активность ЛПЛ, осуществляющей гидролиз ТГ в пре- β -ЛП с последующим их катаболизмом и образованием β - и α -ЛП. Так, было показано, что введение эстрогенов ингибирует, а андрогенов активизирует этот фермент [35, 36] и тем самым оказывает разнонаправленное влияние на количество ТГ и α -ЛП в плазме крови. Снижение активности ЛПЛ и увеличение содержания ТГ были обнаружены нами у крыс под влиянием введения кортизола.

Наличие обратной корреляции между содержанием ТГ и α -ХС ($r=-0,39$) наряду со снижением уровня α -ХС на 10 мг % и дисбалансом гормонов в 1-й группе по сравнению с 3-й позволяет полагать, что одной из причин этого снижения является изменение в секреции и метаболизме половых гормонов, которое приводит к преобладанию биологического действия эстрадиола и кортизола и проявляется в снижении активности ЛПЛ.

Подтверждением этого является более высокое содержание кортизола ($19,02 \pm 1,05$ мкг %) и соотношение эстрадиол/тестостерон ($13,47 \pm 1,2$) у лиц 1-й группы по сравнению с 3-й, в которой эти величины соответственно составляли $12,63 \pm 1,15$ мкг % и $8,62 \pm 1,06$.

В результате последующего выделения в каждой группе— 1, 2 и 3-й— лиц с нормальным (подгруппа а) и повышенным содержанием ТГ (подгруппа б) выявлена и роль гормонов белковой структуры—инсулина и гормона роста — в нарушении обмена ЛП.

У мужчин подгруппы 1б при гипертриглицеридемии, снижении содержания α -ХС и повышении отношения суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС были обнаружены тенденции к снижению содержания эстрадиола, снижению соотношения эстрадиол/тестостерон, тенденции к повышению уровня гормона роста и увеличению содержания инсулина по сравнению с лицами, у которых количество ТГ было в пределах нормы (подгруппа 1а).

В связи с этим представляет интерес сопоставление наших данных с литературными, касающимися влияния инсулина и гормона роста на синтез и катаболизм ТГ. В эксперименте было показано, что увеличение содержания инсулина в перфузате печени сопровождается увеличением липогенеза и секреции ТГ, а дефицит инсулина снижает секрецию ТГ [37, 38]. Кроме того, внутривенное введение инсулина вызывает изменение активности ряда ферментов, стимулирующих синтез жирных кислот, и тем самым способствует липогенезу [39]. При использовании диеты с высоким содержанием углеводов увеличение количества ТГ у большинства людей оказалось следствием увеличения скорости секреции ТГ в печени наряду с увеличением содержания инсулина в плазме крови. При этом коэффициент корреляции между содержанием ТГ и инсулина составлял 0,51 ($P < 0,005$) [40].

Что касается гормона роста, то в эксперименте установлено, что он оказывает противоположное действие — снижает липогенез в печени, а резкое повышение содержания ТГ в плазме крови было обнаружено у карликов при дефиците гормонов роста [41].

По современным представлениям [13], это свидетельствует о том, что гипертриглицеридемия развилась вследствие абсолютной или относительной

недостаточности первого этапа катаболизма пре- β -ЛП — гидролиза ТГ под действием ЛПЛ и превалирования синтеза ТГ пре- β -ЛП над их катаболизмом. В противоположность этому у мужчин с высоким содержанием тестостерона гипертриглицеридемия, по-видимому, является в основном следствием нарушения катаболизма промежуточных ЛП в печени с накоплением их в плазме крови. Об этом свидетельствуют низкие величины соотношений апопротеинов С к апопротеину В и ТГ к апопротеину В в пре- β -ЛП.

Показано, что введение андрогенов повышает активность печеночной ЛПЛ [42], поэтому можно полагать, что одной из причин гипертриглицеридемии у мужчин подгруппы 3б является снижение уровня тестостерона по сравнению с таковым у мужчин подгруппы 3а и вследствие этого недостаточная активность процесса катаболизма промежуточных форм ЛП в печени.

В свете вышеизложенных данных литературы можно полагать, что дисбаланс между количеством инсулина и гормона роста в плазме крови у лиц подгруппы 1б способствует увеличению синтеза и снижению катаболизма ТГ и приводит к гипертриглицеридемии наряду со снижением уровня α -ХС.

У обследованных подгруппы 3б гипертриглицеридемия и снижение уровня α -ХС сопровождались снижением содержания тестостерона, эстрадиола и уменьшением соотношения эстрадиол/тестостерон по сравнению с подгруппой 3а, у обследованных которой содержание ТГ было нормальным.

Подтверждением роли дисбаланса инсулина и гормона роста является более высокая степень положительной корреляции между количеством в плазме крови ТГ и инсулина $r=+0,57$ ($P<0,02$) и между количеством ТГ и соотношением инсулин/гормон роста $r=+0,74$ ($P<0,01$) у 15 человек из подгрупп 2б и 3б, в то время как эти коэффициенты составляли соответственно $r=+0,33$ ($P<0,01$) и $r=+0,42$ ($P<0,01$) у всех обследованных 124 человек.

Таким образом, исследование, выполненное на репрезентативной выборке мужчин в возрасте 40—59 лет, вызванных для эпидемиологического обследования, позволило выявить тех лиц, у которых в плазме крови изменения в содержании гормонов стероидной структуры (тестостерон, эстрадиол, кортизол при увеличении соотношения эстрадиол/тестостерон) сопровождались снижением уровня α -ХС и тенденцией к увеличению отношения суммы ХС атерогенных ЛП к α -ХС. При этом количество общего ХС и ТГ оставалось в пределах нормы и не было обнаружено изменений в количестве инсулина и гормона роста.

В противоположность этому у мужчин, у которых снижение содержания α -ХС сопровождалось гипертриглицеридемией (IIБ и IV тип ГЛП по классификации Фредриксона), имели место снижение уровня эстрадиола и уменьшение соотношения эстрадиол/тестостерон наряду с дисбалансом гормонов белковой природы — инсулина и гормона роста.

Это согласуется с данными Филлипса [43] о снижении уровня эстрадиола и уменьшении соотношения эстрадиол/тестостерон при высоком уровне инсулина у 2 мужчин, перенесших инфаркт миокарда в возрасте 43 лет, по сравнению со средними величинами этих показателей в контрольной группе (13 человек).

Все вышеизложенное позволяет полагать, что существует определенная взаимосвязь между нарушением секреции и метаболизмом стероидных гормонов, инсулина, гормона роста и теми нарушениями в обмене ЛП, которые являются факторами риска ИБС.

В связи с обнаружением нами изменений в количестве гормонов наряду с изменениями в обмене ЛП в плазме крови мужчин в возрасте 40—59 лет, вызванных для эпидемиологического обследования, возникает вопрос о целесообразности синтеза препаратов, позволяющих корректировать дисбаланс гормонов.

Своевременное выявление лиц с дисбалансом гормонов и использование соответствующих препаратов позволяют предупредить развитие тех факторов риска ИБС, которые обусловлены нарушением обмена ЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Castelli W. P., Doyle J. T., Gordon T. — «Circulation», 1975, v. 52, Abstr. 378.— 2. Sidel A. G., Riggs M., Masson B. — «Am. J. Med.», 1974, v. 57, p. 897.— 3. Srinivasan S. R., Frerichs R. R., Webber L. S. et al. — «Circulation», 1976, v. 54, p. 309.— 4. Björkrid B. M., Clin. Fudoer, 1973, v. 2, c. 3.— 5. Stanhope J. M., Sampson V. M., Clarkson P. M. — «Lancet», 1977, v. 1, p. 968.— 6. Castelli W. P., Doyle J. T., Gordon T. et al. — «Circulation», 1977, v. 55, p. 767.— 7. Miller G. J., Miller N. E. — «Lancet», 1975, v. 1, p. 16.— 8. Rhoads G. G., Gulbraudsen C. L., Kagan A. — «New Engl. J. Med.», 1976, v. 294, p. 293.— 9. Hsia S. L., Chao Y. S., Hennekens C. H. et al. — «Lancet», 1975, v. 2, p. 1000.— 10. Garow T. E., Koschinsky T., Hayes S. B. et al. — Ibid., 1976, v. 1, p. 1315.— 11. Stanhope J. M., Priori A. M., Mangano A. J. et al. — «N. Z. med. J.», 1975, v. 82, p. 336.— 12. Glueck C. J., Fallat R. W., Millet F. et al. — «Metabolism», 1975, v. 24, p. 1243.— 13. Eisenberg S. — «Atheroscler. Rev.», 1976, v. 1, p. 49.— 14. Zilverman D. B. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1976, v. 275, p. 138.— 15. Glomset J. A. — «Lipid Res.», 1968, v. 9, p. 155.— 16. Carlsson L. A., Ericsson M. — «Atherosclerosis», 1975, v. 21, p. 435.— 17. Kannel W. B., Castelli W. P., Gordon T. et al. — «Ann. intern. Med.», 1971, v. 74, p. 1.— 18. Björntorp P., Fahlen M., Grimby J. et al. — «Metabolism», 1972, v. 21, p. 1037.— 19. Furman R. H., Alaupovic P., Howard R. P. — «Progr. Biotech. Pharmacol.», 1967, v. 2, p. 215.— 20. Hazard W. R., Spiger M. J., Bagdade J. D. et al. — «New Engl. J. Med.», 1969, v. 280, p. 471.— 21. Hamid M. A., Rubinstein D., Ferguson K. A. et al. — «Biochim. biophys. Acta», 1962, v. 100, p. 179.— 22. Glick S. M., Roth J., Jalow R. S. et al. — «Recent. Progr. Horm. Res.», 1965, v. 21, p. 241.— 23. Kompang I. P., Gibson W. R. — «Horm. Metab. Res. (Stuttg.)», 1976, Bd 8, S. 340.— 24. Siperstein M. D., Unger R. H., Madison L. L. — «J. clin. Invest.», 1968, v. 47, p. 1973.— 25. Macdonald P. C., Rombaut R. P., Siiteri P. K. — «J. clin. Endocr.», 1967, v. 27, p. 1103.— 26. Unger R. H., Eisenroul A. M., Madison L. L. et al. — «Nature», 1965, v. 205, p. 804.— 27. Franz A. G., Rabkin M. T. — «J. clin. Endocr.», 1965, v. 25, p. 1470.— 28. Spellacy W. N., Carlsson K. L., Schade S. L. — «J. A. M. A.», 1967, v. 202, p. 451.— 29. Герасимова Е. Н. — «Тер. арх.», 1976, № 6, с. 40.— 30. Kreisberg R. A., Boshell B. R., De Placido J. et al. — «New Engl. J. Med.», 1967, v. 276, p. 314.— 31. Pirie K. M., Doerr P. — «Acta endocr. (Kbh.)», 1975, v. 80, p. 171.— 32. Kane J. P. — «Analyt. Biochem.», 1973, v. 53, p. 350.— 33. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon I. H. — «J. clin. Invest.», 1955, v. 34, p. 1345.— 34. Pearson W. H., Greep O., Murphy M. — «J. clin. Endocr.», 1967, v. 27, p. 1012.— 35. Fielding C. L., Havel R. J. — «Arch. Pathol.», 1977, v. 101, p. 255.— 36. Hamosh M., Hamosh P. J. — «J. clin. Invest.», 1975, v. 55, p. 1132.— 37. Söten E. G., Kabanvitch A. — «Diabetologia», 1974, v. 10, p. 45.— 38. Assimakopulo Jeannet F., Singh A. et al. — Ibid., p. 155.— 39. Jeu T. T., Greenberg M. M., Paolo Yu et al. — «Horm. Met. Res.», 1976, v. 8, p. 159.— 40. Reaven J. M., Lerner R. L., Stern M. P. et al. — «J. clin. Invest.», 1967, v. 46, p. 1756.— 41. Thomas J. M., Hollander W., Fineberg S. E. — «Metabolism», 1972, v. 21, p. 1053.— 42. Ehnholm C., Hutlinen J. K., Kinnunen P. J. et al. — «New Engl. J. Med.», 1975, v. 292, p. 1314.— 43. Phillips G. B. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1977, v. 74, p. 1729.

Исследования 2111 X 1977 г.

ALTERATIONS IN CONTENT OF HORMONES IN BLOOD PLASMA AND FACTORS OF RISK OF HEART ISCHEMIC IMPAIRMENTS IN 40-59 YEARS OLD MEN

E. N. Gerasimova, I. S. Glasunov, E. A. Bodrova, S. P. Suchkova, V. P. Zylkova, G. I. Burlutsky, N. V. Perova, N. P. Chernyshova, A. A. Zadaya

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

Testosterone, estradiol, hydrocortisone, total cholesterol, triglycerides, cholesterol of α -lipoproteins (α -CS) were estimated in blood plasma of 124 40-59 years old men examined in the course of an epidemiological study (representative selection). Content of insulin was estimated in 112 persons and of growth hormone — in 102 persons. Disbalance of steroid hor-

mones (decrease in α -CS) was observed in men with one factor of risk of heart ischemic impairment. Occurrence of two factors of risk of heart ischemic impairment—hypertriglyceridemia and decrease in α -CS—was related not only to disbalance of steroid hormones but also to alteration in the ratio of protein hormones—insulin and growth hormone.

УДК 616.155.392-07:616.155.3-008.931-074

*В. Н. Филиппова, Л. И. Филановская,
М. Н. Блинов, Е. А. Ушакова*

ИЗМЕНЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ АМФ- И ИМФ-ПИРОФОСФОРИЛАЗЫ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови, Ленинград

Исследовали влияние прогревания и предварительной инкубации с фосфорибозилпирофосфатом на активность АМФ- и ИМФ-пирофосфорилаз в лейкоцитах при хронических формах лимфо- и миелолейкоза.

АМФ-пирофосфорилаза лейкозных лейкоцитов при прогревании до 65°C подвергается инактивации, которая, однако, в отличие от фермента нормальных лейкоцитов оказывается обратимой после инкубации прогретых клеточных экстрактов с фосфорибозилпирофосфатом. ИМФ-пирофосфорилаза лейкоцитов при этой температуре активизируется, причем активация в лейкозных лейкоцитах на 15—20% выше, чем в лейкоцитах здоровых доноров.

Полученные данные свидетельствуют о повышении термостабильности пуридинуклеотидпирофосфорилаз лейкозных лейкоцитов, что является, по-видимому, следствием особенностей конформации ферментных молекул.

Лейкозное перерождение кроветворной ткани сопровождается увеличением в лейкоцитах пула свободных нуклеотидов [1], которое в значительной степени объясняется активированием ферментных систем реутилизационного пути синтеза нуклеотидов, в частности пуридинуклеотидпирофосфорилаз [2—4].

Согласно опубликованным сообщениям [5, 6], активация ферментов, катализирующих синтез нуклеотидов в лейкозных клетках, может быть результатом ослабления ингибирующего влияния на них конечных продуктов данного метаболического пути, что наводит на мысль о появлении структурных особенностей ферментных молекул в процессе развития лейкоза, изучение которых представляет несомненный интерес для понимания биохимических основ развития этих заболеваний.

Особенно большой интерес вызывает изучение структурной организации нуклеотидпирофосфорилаз лейкозных клеток, так как эти ферменты благодаря своему участию в синтезе нуклеотидов оказываются биологическими мишенями ряда лечебных препаратов, используемых для ограничения скорости пролиферации, и данные, полученные в этом направлении исследований, могут способствовать разработке новых способов лечения лейкозов.

В целях выявления возможных структурных различий между пуридинуклеотидпирофосфорилазами нормальных и лейкозных лейкоцитов в работе изучали адаптивные изменения их активности, вызванные факторами, действие которых затрагивает конформацию ферментных молекул. Из числа таких факторов были использованы тепловая обработка ферментов (7) и их предварительная инкубация с фосфорибозилпирофосфатом (ФРПФ), который является не только ко субстратом пуридинуклеотидпирофосфорилаз [8], но также и стабилизатором АМФ-пирофосфорилазы, поддерживающим активную форму фермента [9].

Методика

Лейкоциты выделяли из крови больных лейкозами, а также здоровых доноров с помощью цитрат-желатинового раствора [10] и фикола [11]. После двукратного промывания физиологическим раствором, содержащим 0,1% ЭДТА, осадок клеток обрабатывали

охлажденным до -20°C ацетоном и экстракты ацетоновых порошков (5 мг ацетонового порошка клеток и 1,0 мл 0,05 М трис-буфера pH 7,5) использовали как источник частично очищенных препаратов АМФ- и ИМФ-пирофосфорилазы.

Состав инкубационной смеси и условия инкубации приводятся в примечаниях к таблицам. Использовали препарат ФРПФ, синтезированный по модифицированному нами методу [12]. Реакцию останавливали 3-минутным нагреванием при 100°C , и образовавшиеся в ходе реакции ^{14}C -АМФ, ^{14}C -ИМФ и ^{14}C -ГМФ изолировали по методу Шлосберга и Холландера [13]. Радиоактивность подсчитывали в толуоловом сцинтиляторе на счетчике СБС-1. Активность ферментов выражали в микромолях оснований, превращенных в мононуклеотиды в единицу времени в расчете на 1 г белка.

Т а б л и ц а 1

Активность пуриинуклеотидпирофосфорилаз лейкоцитов человека

Нозологические единицы	% бластных клеток	АМФ-пирофосфорилаза		ИМФ-пирофосфорилаза			
		экстракт не прогрет	экстракт прогрет 4 мин, 65°C	с ^{14}C -гипоксантином		с ^{14}C -гуанином	
				экстракт не прогрет	экстракт прогрет 4 мин, 65°C	экстракт не прогрет	экстракт прогрет 4 мин, 65°C
Здоровые доноры:							
гранулоциты	0	$1,0 \pm 0,9$	$0,7 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,4$	$5,0 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,5$
лимфоциты	0	$2,4 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,4$	—	—
Хронический лимфолейкоз	5—7	$3,2 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,6$	$8,0 \pm 0,9$
Хронический миелолейкоз	До 10	$0,9 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,5$	—	—

П р и м е ч а н и я. Активность ферментов выражена в микромолях превращаемого основания на 1 г белка в 1 мин. Влияние температуры на каталитическую активность пуриинуклеотидпирофосфорилаз изучали, подвергая экстракты клеток прогреванию при 65°C в течение 4 мин. Состав инкубационной смеси для определения активности АМФ-пирофосфорилазы (мкмоль): экстракт ацетонового порошка клеток 100—150 на 1 мкг белка; ФРПФ 0,25; трис-буфер 10; ^{14}C -аденин 0,8 (удельная радиоактивность $1,8 \cdot 10^6$ имп/мин/мкмоль). Объем проб 0,4 мл. Инкубация 15 мин при 37°C . Активность ИМФ-пирофосфорилазы определяли в присутствии ^{14}C -гипоксантина (удельная радиоактивность $2,2 \cdot 10^6$ имп/мин/мкмоль) и ^{14}C -гуанина ($3,4 \cdot 10^6$ имп/мин/мкмоль). Пробы содержали 0,5 мкмоль ^{14}C -гипоксантина и 0,2 мкмоль ^{14}C -гуанина. Инкубация 5 мин при 37°C .

Результаты и обсуждение

Лейкоциты периферической крови человека, как представлено в табл. 1, содержат активные ферментные системы, осуществляющие в присутствии ФРПФ синтез мононуклеотидов из свободных азотистых оснований. АМФ-пирофосфорилаза (АМФ-пирофосфатфосфорибозилтрансфераза, К.Ф. 2.4.2.7) катализирует синтез АМФ из аденина, тогда как от ИМФ-пирофосфорилазы (ИМФ-пирофосфатфосфорибозилтрансфераза, К.Ф. 2.4.2.8) зависит образование ИМФ и ГМФ из гипоксантина и гуанина. Эти ферменты в лейкоцитах характеризуются разным уровнем активности. Так, активность АМФ-пирофосфорилазы гранулоцитов в 3 раза ниже активности ИМФ-пирофосфорилазы, если субстратом последней оказывается гипоксантин, и в 5 раз ниже, если им оказывается гуанин.

Лимфоциты обладают более высокой активностью, чем гранулоциты. Однако активность АМФ-пирофосфорилазы в них превышает активность ИМФ-пирофосфорилазы на меньшую величину, чем в гранулоцитах.

Следует отметить, что литературные данные, характеризующие активность пуриинуклеотидпирофосфорилаз в лейкоцитах, неоднородны. Наблюдающийся разброс величин объясняется, по-видимому, различием методических приемов, используемых разными авторами.

Согласно результатам наших исследований, пуриинуклеотидпирофосфорилазы лейкоцитов, как и других клеток, например асцитной карциномы Эрлиха [14] или эритроцитов [15], чувствительны к действию температур-

Влияние прогревания и предварительной инкубации экстрактов с ФРПФ на активность пурипнуклеотидпирофосфорилаз лейкозных лейкоцитов

Условия проведения реакции	АМФ-пирофосфорилаза				ИМФ-пирофосфорилаза			
	здоровые доноры		ХЛЛ	ХМЛ	здоровые доноры		ХЛЛ	ХМЛ
	лимфоциты	гранулоциты			лимфоциты	гранулоциты		
В присутствии 50% содержания ФРПФ -- 1,2 мкмоль	1,7±0,9	0,81±0,15	2,4±0,4	0,7±0,21	1,8±0,2	1,4±0,1	2,0±0,3	1,6±0,1
Предварительная инкубация экстракта с ФРПФ 30 мин при 0°C	1,2±0,5	0,76±0,2	2,3±0,5	0,6±0,2	—	—	1,9±0,1	1,4±0,1
Предварительное прогревание экстракта 4 мин при 65°C	0,9±0,3	0,49±0,3	0,65±0,2	0,35±0,2	2,1±0,4	2,2±0,3	2,8±0,15	2,8±0,1
Предварительная инкубация прогретого экстракта с ФРПФ 30 мин при 0°C	0,6±0,1	0,42±0,3	2,4±0,8	0,5±0,1	2,3±0,1	—	2,6±0,15	3,2±0,2

Примечания. Результаты выражены в мкмоль превращаемого основания на 1 г белка в 1 мин. При изучении влияния температуры фактора и предварительной инкубации клеточных экстрактов с ФРПФ на активность пурипнуклеотидпирофосфорилаз концентрация его в пробах составила 50% от количества, обеспечивающего максимальную скорость реакции. Состав реакционной среды указан в примечании к табл. 1.

ного фактора. Прогревание в течение 4 мин при 65°C вызывает резкую инактивацию АМФ-пирофосфорилазы и сопровождается значительной активацией ИМФ-пирофосфорилазы.

Активность пурипнуклеотидпирофосфорилаз в лейкоцитах при лейкозах варьирует в зависимости от формы заболевания. Так, при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) активность этих ферментов практически поддерживается на уровне, характерном для лейкоцитов здоровых людей (см. табл. 1). Эти данные совпадают с результатами исследования Лугановой и Сейца [16], а также Дитца и Чеботар [17], которые не обнаружили изменений активности АМФ-пирофосфорилазы в лейкоцитах при этой форме лейкоза. В то же время они противоречат данным других исследователей, указавших на активирование ИМФ-пирофосфорилазы на 40—50% в лейкоцитах при ХМЛ [2].

В лейкоцитах больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) по сравнению с нормальными лимфоцитами несколько активируется АМФ-пирофосфорилаза (на 25%), тогда как активность ИМФ-пирофосфорилазы остается без изменений. По данным Дэвидсона и Винтера [2], при ХЛЛ АМФ-пирофосфорилаза активируется на 30—32%.

Результаты работы были получены при обследовании больных с лейкемической формой ХМЛ и ХЛЛ, характеризующейся содержанием в крови 200—350 тыс. лейкоцитов в 1 мкл, из которых blastные клетки составляли не более 10% от общего количества клеток. Однако, как показывают приведенные данные, закономерного повышения активности пурипнуклеотидпирофосфорилаз, связанного с увеличением скорости пролиферации, установить не удалось. Обнаруженные изменения активности не были однотипными при исследованных формах лейкоза. На этот факт обратили внимание также Дитц и Чеботар [17]. Очевидно, уровень активности пурипнуклеотидпирофосфорилаз лейкоци-

гов устанавливается в зависимости от особенностей клеточного обмена, существование которых для каждого из вариантов лейкоза было показано Сейцем и Лугановой [18].

В свете этих данных усиливается интерес к изучению свойств пурипнуклеотидпирофосфорилаз лейкоцитов при разных формах лейкоза. В табл. 2 представлены величины характеризующие влияние температуры на активность исследуемых ферментов. Как можно видеть, при прогревании до 65°C АМФ-пирофосфорилаза инактивируется на 55 % в нормальных лейкоцитах, на 50 % при ХМЛ, и на 32 % при ХЛЛ. ИМФ-пирофосфорилаза при этом активируется, причем в лейкозных клетках активация на 15—20 % выше, чем в нормальных лейкоцитах.

При анализе полученных данных обращает на себя внимание тот факт, что стабильность эффекта прогревания ферментов в разных клетках различна. Если тепловая инактивация АМФ-пирофосфорилазы нормальных лейкоцитов носит характер необратимых изменений, то инактивация АМФ-пирофосфорилазы лейкоцитов обратима и последующая инкубация экстрактов этих клеток с ФРПФ сопровождается частичным (на 83 % при ХМЛ) или полным (при ХЛЛ) восстановлением активности фермента. Таким образом, в отношении действия температуры у АМФ-пирофосфорилазы лейкоцитов при разных формах лейкоза обнаруживаются общие свойства.

ИМФ-пирофосфорилаза нормальных и лейкоэмических лейкоцитов подвергается при прогревании однотипным изменениям, выражающимся в активировании фермента, которое, однако, усиливается при лейкозе.

Обратимость тепловой инактивации АМФ-пирофосфорилазы лейкозных лейкоцитов и более резко выраженная, чем в нормальных лейкоцитах, активация ИМФ-пирофосфорилазы при прогревании до 65°C указывает на повышение теплостабильности этих ферментов. В этой связи интересно отметить, что Рубин и Бейлис [15] наблюдали повышение теплостабильности АМФ-пирофосфорилазы эритроцитов при наследственном нарушении пуринового обмена.

Известно [19], что теплостабильность ферментов зависит от деталей конфигурации их белковой части. На этом основании можно предположить, что найденные изменения теплоустойчивости пурипнуклеотидпирофосфорилаз лейкозных клеток обусловлены особенностями их конформации.

Отмеченное в работе восстановление активности прогретой АМФ-пирофосфорилазы при инкубации с ФРПФ, а также активирование в этих условиях ИМФ-пирофосфорилазы лейкозных лейкоцитов могут указывать на сохранение при лейкозном перерождении механизма регуляции активности этих ферментов.

Обнаруженный нами, а также другими исследователями [17] фактор отсутствия закономерного активирования пурипнуклеотидпирофосфорилаз в лейкоцитах при хронических лейкозах не позволяет рассматривать их в качестве основных ферментных систем, обеспечивающих активную пролиферацию кроветворной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nakai G. S., Craddock Ch. G.— *Cancer Res.*, 1965, v. 25, p. 575—578.— 2. Davidson J. D., Winter T. S.— *Ibid.*, 1964, v. 24, p. 261—267.— 3. Луганова И. С., Сейц И. Ф.— В кн.: Научная сессия Ленинградского НИИ гематологии и переливания крови. Материалы. Л., 1967, с. 85—88.— 4. Rosman M., Williams H. E.— *Cancer Res.*, 1973, v. 33, p. 1202—1209.— 5. Parger M. D., Bryan S. E., Hill J. M. et al.— *Blood*, 1963, v. 22, p. 818.— 6. *Current Research in Leukemia*. Ed. F. G. J. Hayhoe. London, 1965.— 7. Frieden C.— *J. biol. Chem.*, 1963, v. 238, p. 146—155.— 8. Kornberg A., Lieberman I.— *Ibid.*, 1955, v. 215, p. 381—402.— 9. Jip L. C., Balis M. E.— *Biochemistry (Wash.)*, 1975, v. 14, p. 3204—3207.— 10. Луганова И. С. Метод выделения лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитов из крови человека (Метод. указания для диагностических и иммунологических лабораторий). Л., 1971.— 11. Wettenhall R. E. H., London D. R.— *Biochim. biophys. Acta*, 1974, v. 349, p. 214—225.— 12. Филиппова В. Н., Филановская Л. И., Бля-

нов М. Н.— *Вопр. мед. химии*, 1975, № 6, с. 663—665.— 13. Schlosberg M. A., Hollander V. P.— *Analyt. Biochem.*, 1973, v. 55, p. 9—15.— 14. Hori M., Henderson J. F.— *J. biol. Chem.*, 1966, v. 241, p. 3404—3408.— 15. Rubin Ch. S., Balis M. E.— *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 279, p. 163—174.— 16. Seitz J. F. *The Biochemistry of the Cells of Blood and Bone Marrow*. Springfield, 1969.— 17. Dietz A. A., Czebotar V.— *Cancer Res.*, 1977, v. 37, p. 419—426.— 18. Сейц И. Ф. *Взаимодействие дыхания и гликолиза в клетке и сопряженное фосфорилирование*. Л., 1961.

Поступила 21/X 1977 г.

ALTERATION IN THERMOSTABILITY OF AMP- AND IMP-PYROPHOSPHORYLASES FROM LEUKOCYTES IN LEUKOSES

V. N. Filippova, L. I. Filanovskaya, M. N. Blinov, E. A. Ushakova

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Leningrad

Effect of thermic treatment and of pre-incubation with phosphoribosyl pyrophosphate on activity of AMP- and IMP-pyrophosphorylases were studied in leukocytes under chronic forms of limpho- and myeloleukoses. AMP-pyrophosphorylase from leukemic leukocytes was inactivated after heating up to 65°, which, at the same time, as distinct from the enzyme of normal leukocytes, proved to be reversibly reduced after incubation of the heated cell extracts with phosphoribosyl pyrophosphate. IMP-pyrophosphorylase of leukocytes was activated at this temperature; the activation of the enzyme was 15-20% higher in leukemic leukocytes than in leukocytes of healthy donors. The data obtained demonstrate the increased thermostability of purine nucleotide pyrophosphorylases from leukemic leukocytes, which is apparently due to conformational peculiarities of the enzyme molecules.

УДК 616.132-008.939.631

A. B. Попов, А. С. Кузнецов, В. Т. Лозовский

ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ В СОСТАВЕ ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА

Отдел атеросклероза им. акад. Н. Н. Анчикова Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Изучение липид-белковых комплексов, выделенных из непораженных участков аорты человека, а также из участков аорты, вовлеченных в атеросклеротический процесс, показало, что в артериальной стенке имеются частицы, иммунологически идентичные пре-β- и β-липопротеидам и близкие им по размерам. Однако измененная электрофоретическая подвижность этих частиц на ацетатцеллюлозе, выявление в их составе гликозаминогликанов, более низкая величина скорости флотации в бессолевом растворе по сравнению с соевым при аналитическом ультрацентрифугировании свидетельствуют об определенных различиях между липопротеидами сыворотки крови и липопротеидами сосудистой стенки, что можно рассматривать как результат комплексообразования липопротеидов в стенке сосуда с гликозаминогликанами.

Морфологическими и биохимическими исследованиями доказано наличие в сосудистой стенке липопротеидов, иммунологически идентичных липопротеидам плазмы крови [1—4].

Характер взаимодействия липопротеидов как с клеточными, так и с внеклеточными структурами стенки сосуда в значительной мере определяет их дальнейшую судьбу. Способность гликозаминогликанов (ГАГ) сосудистой стенки формировать комплексы с атерогенными липопротеидами, по мнению ряда исследователей, может играть важную роль в развитии атеросклеротического процесса [5—12]. В настоящее время нет исчерпывающих данных о превращениях липопротеидов в стенке сосуда, равно как и о состоянии липид-белковых комплексов сосудистой стенки в целом. Изучение этого вопроса необходимо для понимания динамики как прямого, так и обратного развития атеросклеротического процесса. Задачей настоящего исследования явилось изучение липид-белковых комплексов, выделенных из неизмененных участков аорт, а также из участков, вовлеченных в атеросклеротический процесс.

М е т о д и к а

Работа проведена на 38 аортах, взятых от людей в возрасте от 18 до 78 лет не позже чем через 24 ч после смерти. Неизмененные участки, а также аорты с атеросклеротическим поражением различного характера вырезали в соответствии с их макроскопической характеристикой (неизмененный участок, липидное пятно, липидная бляшка и фиброзная бляшка). Выделенную из соответствующих участков интиму измельчали ножницами, заливали 3 объемами раствора для экстракции (0,15 М NaCl, содержащий 0,001 М ЭДТА и 0,005 М трис-HCl, pH 7,4) на 24 ч. Экстракт сливали, а ткань аорты помещали в центрифужную пробирку с перфорированной перегородкой, покрытой бумажным фильтром, заливали 4 объемами раствора для экстракции и центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин. Собранный со дна пробирки экстракт объединяли с экстрактом, полученным ранее, и центрифугировали 15 мин при 2000 об/мин для отделения слоя всплывших свободных липидов. Инфранатант концентрировали в полиэтиленгликоле и использовали для дальнейших исследований.

Распределение компонентов экстракта по молекулярной массе (22 опыта) исследовали на геле АсА-34 (колонка 2,6×40,0 см) и затем на сефарозе 2В (колонка 1×35 см) с определением во фракциях белка (по поглощению при 280 нм), уроновых кислот [13], холестерина [14]. Для калибровки хроматографических колонок использовали хиломикроны и липопротеиды, выделенные из сыворотки крови человека методом ультрацентрифугирования [15], а также глюкоуроновую кислоту.

В другой серии исследований (16 опытов) первым этапом обработки экстракта аорты было центрифугирование при условиях, которые обычно используются для отделения хиломикронов, т. е. при 26 000 g в течение 30 мин. Фракцию, флотирующую в этих условиях, обозначали как «липидный слой». Осадок ресуспендировали в растворе для экстракции и после центрифугирования при 2500 об/мин в течение 1 ч полученный супернатант называли «рерастворимый осадок». Материал экстракта, находящийся между «липидным слоем» и осадком, обозначали как «средний слой». Перед проведением дальнейших этапов исследования «средний слой» подвергали гель-фильтрации на ультрагеле АсА-34 для очистки от белков с молекулярной массой менее 400 000.

Для выделения компонентов экстракта, флотирующих как липопротеиды очень низкой и низкой плотности, проводили ультрацентрифугирование экстракта в плотности 1,063, приготовленной из 0,15 М NaCl в D₂O, при 105 000 g в течение 24 ч (15 опытов). D₂O для приготовления плотности использовали вместо KBr, чтобы избежать диссоциации присутствующих в растворе комплексов липопротеиды — ГАГ.

С целью установления доли липопротеидов, находящихся в комплексе с ГАГ, в 7 опытах определяли холестерин липопротеидов очень низкой и низкой плотности, осаждаемых в присутствии ионов Ca⁺⁺ (0,025 М).

Фракции, полученные после гель-фильтрации и ультрацентрифугирования, в дальнейшем анализировали с помощью ряда методов: иммунодиффузия в агаре [16], диск-электрофорез липопротеидов в полиакриламидном геле [17], микросонный электрофорез липопротеидов [18] и ГАГ, выделенных из комплекса липопротеиды — ГАГ на ацетатцеллюлозе [10], аналитическое ультрацентрифугирование (ультрацентрифуга модель E, «Beckman»). Негативы фотоснимков, отражающих данные диск-электрофореза, и полученные на ацетатцеллюлозе электрофореграммы сканировали на микросонном денситометре (модель R-110, «Beckman»).

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

Последовательная двухэтапная хроматография экстракта аорты на ультрагеле АсА-34, а затем на сефарозе 2В позволила разделить компоненты экстракта аорты по молекулярной массе на 3 фракции. На ультрагеле АсА-34 (рис. 1, А) была отделена фракция с молекулярной массой <400 000 (пик 2), включающая и α-липопротеиды. Пик 1, элюированный со свободным объемом, при последующей хроматографии на сефарозе 2В дал пики 3 и 4 (рис. 1, Б). Молекулярная масса компонентов пика 3 соответствовала молекулярной массе хиломикронов, а молекулярная масса компонентов пика 4 соответствовала молекулярной массе липопротеидов очень низкой и низкой плотности. Анализ фракций, полученных на сефарозе 2В, показал, что компонентами пиков 3 и 4 являются белок, холестерин и уроновые кислоты (рис. 1, Б). Гель-фильтрация на сефарозе 2В позволила установить, что положение компонентов «липидного слоя» соответствует положению пика 3 (рис. 1, В). Аналогичные результаты получены и для «рерастворимого» осадка. «Средний слой» состоит из компонентов как пика 3, так и пика 4 (рис. 1, Г). Несмотря на индивидуальную вариабельность в соотношении между величинами площадей пиков (по поглощению при 280 нм), отмечается довольно четкая тенденция к относительному увеличению площади

пика высокомолекулярного компонента и снижению площади пика низкомолекулярного компонента с возрастом (уравнение регрессии $y = 0,66 \cdot x - 16,00$; коэффициент корреляции 0,79 при уровне значимости 0,05) в экстрактах из неизмененных участков аорты (рис. 1, Д). С увеличением тяжести атеросклеротического поражения такое изменение соотношения площадей пиков фракции «среднего слоя» выражено более сильно: для возраста 45—70 лет относительная доля площади пика высокомолекулярного компонента

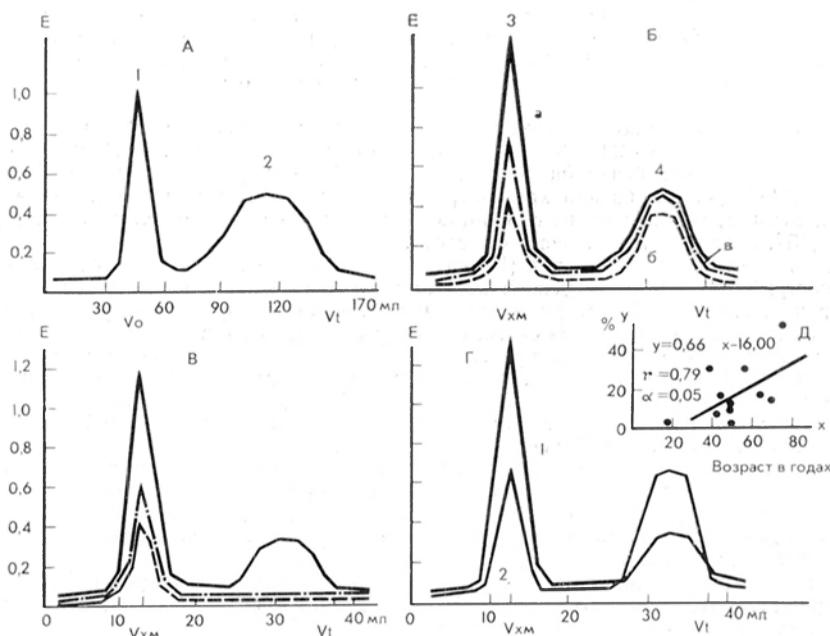


Рис. 1. Гель-фильтрация экстрактов сосудистой стенки.

a — белок (поглощение при 280 нм); *б* — уронеовые кислоты (поглощение при 520 нм); *в* — холестерин (поглощение при 550 нм).
A — разделение общего экстракта на ультрагеле АСА-34 (пик 1 — компоненты с молекулярной массой $>400\ 000$, пик 2 — компоненты с молекулярной массой $<400\ 000$); *B* — разделение пика 1 выделенного на геле АСА-34, на сефарозе 2В (пик 3 — компоненты, по молекулярной массе соответствующие хиломикронам, пик 4 — компоненты, по молекулярной массе соответствующие липопротеидам очень низкой и низкой плотности);
B — разделение фракции «липидного слоя» экстракта непораженных участков аорты на сефарозе 2В; *Г* — разделение фракции «среднего слоя» экстракта непораженных участков аорты на сефарозе 2В после предварительной очистки на геле АСА-34 (1 — возраст 70 лет, 2 — возраст 40 лет).
Д — зависимость относительной доли площади пика 3 от возраста для непораженных участков аорты (ось *y* — процентная доля площади пика 3, 100% — сумма площадей пиков 3 и 4; ось *x* — возраст в годах).

из непораженных участков аорты в 3 раза меньше, чем из пораженных. Методом иммунопреципитации в агаре было показано наличие в «среднем слое» пре- β -липопротеидов и β -липопротеидов, иммунологически идентичных таковым сыворотки крови.

Результаты диск-электрофореза экстрактов аорты представлены на рис. 2. При электрофорезе «липидного слоя» окрашенный суданом материал оставался на старте (рис. 2, Б). Аналогичные данные получены и для «нерастворимого осадка». При электрофорезе «среднего слоя» окрашенные суданом полосы выявились в области пре- β -липопротеидов и β -липопротеидов, соотношение между которыми подвергалось значительным индивидуальным колебаниям. Фракция, расположенная в области β -липопротеидов, обычно сильнее была выражена в экстрактах из неизмененных участков аорты, а также из участков с начальными атеросклеротическими поражениями (липидное пятно, липидная бляшка) у людей в более молодом возрасте (рис. 2, В, Г). В экстрактах из неизмененных участков аорты людей более старшей возрастной группы и из фиброзных бляшек преобладающей и часто един-

ственной являлась фракция, расположенная в области пре-β-липопротеидов (рис. 2, Д, Е).

Данные колоночной хроматографии и диск-электрофореза свидетельствуют о том, что по крайней мере часть липопротеидов сосудистой стенки имеет молекулярную массу, приближающуюся к молекулярной массе пре-β- и β-липопротеидов. При этом для возрастных изменений, а также для изменений, связанных с развитием атеросклеротического процесса, характерна тенденция к увеличению доли липопротеидов с большой молекулярной массой.

При электрофорезе фракций экстракта аорты на ацетатцеллюлозе было установлено, что «липидный слой» и «растворимый осадок» при окраске на липиды давали одну полосу в области старта (рис. 3, Б, В). «Средний слой» давал полосу, окрашивающуюся на липид, с подвижностью, равной или большей, чем подвижность пре-β-липопротеидов; следы липида оставались также на старте (рис. 3, Г, Д). Липопротеиды, выделенные со вторым пиком при гель-фильтрации на сефарозе 2В, также давали полосу, окрашивающуюся на липид с подвижностью, равной или большей, чем у пре-β-липопротеидов. Средние величины подвижности фракций по данным деиситометрии сыворотки крови человека для β-, пре-β- и α-липопротеидов соответственно равны $37,7 \pm 2,6$; $64,7 \pm 7,0$; $104 \pm 7,3$ мм, а средняя величина подвижности липопротеидов, выделенных из экстракта аорты, составляет $76,2 \pm 3,3$ мм. В этих опытах не было обнаружено фракции с подвижностью β-липопротеидов, несмотря на то что в параллельных пробах при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле (см. рис. 2) выявлялись липопротеиды с молекулярной массой, соответствующей молекулярной массе как пре-β-, так и β-липопротеидов. Окраска параллельных ацетатцеллюлозных электрофореграмм экстрактов аорты альциановым синим позволила выявить во всех случаях наличие ГАГ в виде пятен, электрофоретическая подвижность которых была значительно больше электрофоретической подвижности α-липопротеидов (рис. 3, Ж). Средние величины подвижности по данным деиситометрии соответственно равны 268 ± 42 и $104 \pm 7,3$ мм.

Модельные опыты по изучению электрофоретической подвижности на ацетатцеллюлозе β-липопротеидов человека при смешивании их с гепарином в весовом соотношении 1:20 показали, что β-липопротеиды при этом приобретают большую подвижность и выявляются в виде одной полосы в области, соответствующей подвижности пре-β-липопротеидов (рис. 3, Е).

Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе указаниями о большей электрофоретической подвижности комплекса липопротеиды—ГАГ [6, 7, 9], а также о его способности к диссоциации в электрическом поле [19, 20] и одновременно являются наглядным доказательством присутствия ГАГ в комплексе с липопротеидами, выделенными из аорты.

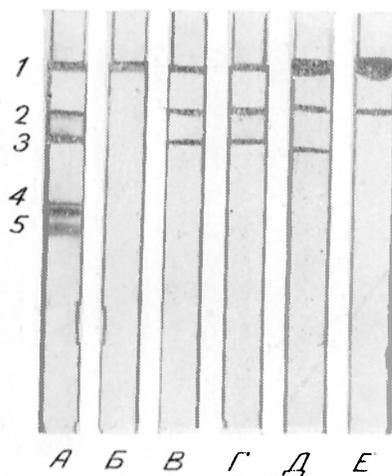


Рис. 2. Диск-электрофорез липопротеидов в полиакриламидном геле.

А — контрольная сыворотка; Б — фракция «липидного слоя»; В, Г — средний слой непораженных участков аорты и участков с ранними стадиями атеросклеротического поражения (липидное пятно и липидная бляшка); Д, Е — средний слой непораженных участков аорты людей более старшей возрастной группы и участков с поздними стадиями атеросклеротического поражения (фиброзная бляшка).
1 — старт; 2 — липопротеиды очень низкой плотности (пре-β-липопротеиды); 3 — липопротеиды низкой плотности (β-липопротеиды); 4 — липопротеиды высокой плотности (α-липопротеиды); 5 — комплекс альбумин — неэстерифицированные жирные кислоты.

Анализ ГАГ методом электрофореза на ацетатцеллюлозе показал, что в «липидном слое» присутствуют гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат А и (или) С — оба хондроитинсульфата движутся вместе — и гепарин (рис. 3, И). Во фракции «растворимого осадка» выявляются гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты А(С), а также компонент с электрофоретической подвижностью меньшей, чем у гиалуроновой кислоты (рис. 3, К). Для «среднего слоя» характерно наличие глюкуроновой кислоты и хондроитинсульфатов А (С) (рис. 3, Л). Аналогичные результаты получены и для фракции, флотирующей в плотности 1,063.

С целью установления доли не связанных с ГАГ липопротеидов нами была предпринята попытка осаждения из экстракта аорты комплекса липо-

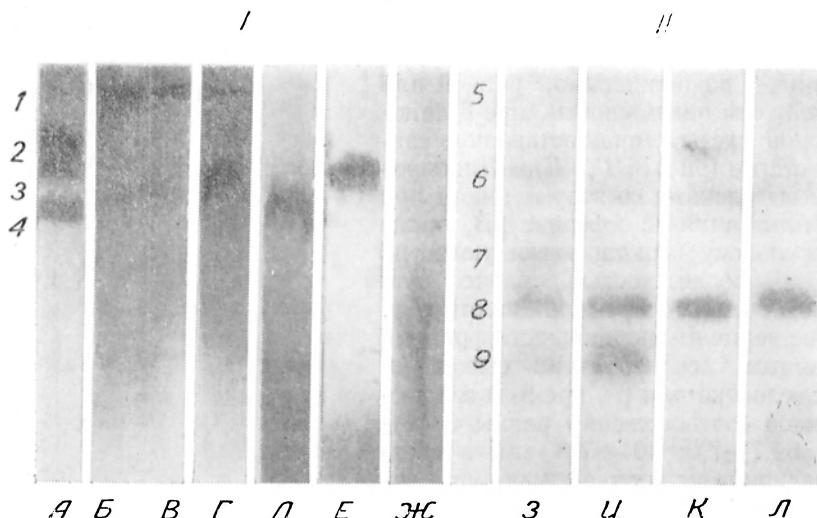


Рис. 3. Электрофорез на ацетатцеллюлозе.

I — разделение липопротеидов и комплексов липопротеиды — ГАГ:
 А — контрольная сыворотка (окраска Oil Red O); Б — «липидный слой»; В — «растворимый осадок»;
 Г, Д — «средний слой»; Е — смесь липопротеиды низкой плотности — гепарин (40 : 1); Ж —
 «средний слой», окрашенный на ГАГ (алциановый синий);
 1 — старт; 2 — липопротеиды низкой плотности; 3 — липопротеиды очень низкой плотности; 4 —
 липопротеиды высокой плотности;
 II — разделение ГАГ:
 З — смесь стандартных ГАГ; И — «липидный слой»; К — «нерастворимый осадок»; Л — средний слой;
 5 — старт; 6 — гиалуроновая кислота; 7 — хондроитинсульфат В; 8 — хондроитинсульфаты А и С;
 9 — гепарин.

протеиды — ГАГ в присутствии ионов Ca^{++} в концентрации 0,025 М. В среднем $34,9 \pm 2,2\%$ холестерина липопротеидов очень низкой и низкой плотности экстракта аорты не осаждалось в этих условиях. Однако при последующем анализе выявлено наличие глюкуроновой кислоты и хондроитинсульфата А (С) во фракции липопротеидов, не осажденных в присутствии ионов Ca^{++} . Таким образом, доля холестерина липопротеидов очень низкой и низкой плотности, не связанных с ГАГ, представляет собой величину меньшую, чем $34,9 \pm 2,9\%$.

При аналитическом ультрацентрифугировании «среднего слоя» экстракта пораженной атеросклерозом аорты выявлены 2 компонента: седиментирующий и флотирующий ($S_f = 5,9$) в растворе 0,15 М NaBr на D_2O с плотностью 1,063. Характер профиля флотирующего компонента отличался от типичного профиля липопротеидов сыворотки крови. При ультрацентрифугировании параллельной пробы в растворе NaBr той же плотности скорость флотации липопротеидов экстракта аорты возрастала почти вдвое ($S_f = 11,4$), что могло явиться результатом частичной диссоциации комплекса липопротеиды — ГАГ, обычно наблюдаемой при увеличении ионной силы раствора. Следовательно, с помощью аналитического ультрацентрифугирования нам также не удалось выявить наличия в сосудистой стенке липопро-

теидов, которые бы по своим свойствам полностью соответствовали липопротеидам сыворотки крови.

Таким образом, изучение липид-белковых комплексов аорты человека показало, что наряду с макромолекулярными комплексами в стенке сосуда имеются частицы, иммунологически идентичные пре- β - и β -липопротеидам сыворотки крови и соответствующие им по размеру. Однако их увеличенная электрофоретическая подвижность на ацетатцеллюлозе, выявление в их составе ГАГ, атипичный профиль при аналитическом ультрацентрифугировании и возрастание скорости флотации при увеличении ионной силы раствора не дают нам оснований для утверждения о полной идентичности липопротеидов сосудистой стенки и сыворотки крови. По-видимому, с известной долей осторожности можно сделать предположение, что основная часть пре- β - и β -липопротеидов сосудистой стенки находится и метаболизирует в составе комплекса с ГАГ, характер которого определяется особенностями реактивности сосудистой стенки, а также стадией атеросклеротического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith E. B., Slater R.— *Atherosclerosis*, 1970, v. 11, p. 417—438.
2. Денисенко А. Д., Климов А. Н.— *Бюлл. exper. биол.*, 1975, № 6, с. 44—47.
3. Hoff H. F., Heideman C. L., Gaubatz J. W. et al.— *Circulat. Res.*, 1977, v. 40, p. 56—64.
4. Scott P. S., Hurley P. J.— *Israel J. med. Sci.*, 1969, v. 5, p. 631—634.
5. Gerö S., Gergely J., Dévényi T. et al.— *J. Atheroscler. Res.*, 1961, v. 1, p. 67—73.
6. Gerö S.— *Symp. Zool. Soc. London*, 1964, v. 11, p. 169—172.
7. Gerö S., Bikari-Varga M., Virag S.— In: *Vascular and Neurological Changes in Early Diabetes*. New York, 1973, p. 103—110.
8. Adams C. W. M., Bayliss O. B.— *Atherosclerosis*, 1973, v. 18, p. 191—195.
9. Srinivasan S. R., Lopes S. A., Badharkrishnamurthy B. et al.— *Ibid.*, 1970, v. 12, p. 321—334.
10. Srinivasan S. R., Dolan P., Radhakrishnamurthy B. et al.— *Ibid.*, 1972, v. 16, p. 95—104.
11. Srinivasan S. R., Dolan P., Radhakrishnamurthy B. et al.— *Biochim. biophys. Acta*, 1975, v. 388, p. 58—70.
12. Berenson G. S.— *Advanc. exp. Med. Biol.*, 1974, v. 43, p. 141—154.
13. Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G.— *Analyt. Biochem.*, 1973, v. 54, p. 484—489.
14. Okinobu Okabe, Takeshi Katayama, Yasuhiro Kanemasa— *Acta Med. Okayama*, 1974, v. 28, p. 403—410.
15. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon I. H.— *J. clin. Invest.*, 1955, v. 34, p. 1345—1352.
16. Quchterlony O.— *Acta path. microbiol. scand.*, 1953, v. 32, p. 321—327.
17. Маграчева Е. Я.— *Вопр. мед. химии*, 1973, № 6, с. 625—655.
18. Grabner W., Gronauer W., Berg G. et al.— *Clin. chim. Acta*, 1970, v. 28, p. 299—310.
19. Masubuchi M., Miura S., Yosizawa Z.— *J. Biochem.*, 1975, v. 77, p. 617—626.
20. Böttcher C. J. F., Woodford F. P., Klynstra F. B.— *J. Atheroscler. Res.*, 1963, v. 3, p. 24—31.

Поступила 15/Х 1977 г.

GLYCOSAMINEGLYCANS OCCURRING IN LIPOPROTEIN COMPLEX OF HUMAN AORTA

A. V. Popov, A. S. Kuznetsov, V. T. Losovsky,
Department of Atherosclerosis

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

Lipoprotein complexes were studied in intact parts of human aorta as well as in areas of aorta impaired with atherosclerosis. The arterial walls contained particles, which were similar to pre- β and β -lipoproteins as evidenced by immunological properties and by size. At the same time, lipoproteins of the vascular walls differed distinctly from those of blood serum because these former lipoproteins possessed altered electrophoretic mobilities in acetyl cellulose, contained glycosamineglycans, exhibited lower rate of flotation in salt-free solution as compared with the salt-containing solution under conditions of analytical ultracentrifugation. The data obtained suggest that the lipoproteins formed complexes with glycosamineglycans in vascular walls.

Н. Я. Головенко

СИНТЕЗ АМИНОГЛЮКУРОНИДОВ В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС ЗАВИСИМОСТЬ ПРОЦЕССА ОТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУБСТРАТА

Лаборатория психотропных препаратов Одесского университета им. И. М. Мечникова

Внутрибрюшинное введение белым крысам 5-замещенных ($R = NH_2, CH_3, H, Cl$) 2-аминобензофенонов приводит к биосинтезу их N-глюкуронидов. Количество выводимых с мочой свободных соединений и глюкуроноконъюгатов зависит от природы заместителей, отличающихся друг от друга значениями констант Гаммета, липофильностью и основностью. Сопоставление физико-химических свойств заместителей исследуемых веществ с количеством обнаруженных в моче глюкуронидов дает удовлетворительную корреляцию только на примере констант Гаммета.

Конъюгация с глюкуроновой кислотой является одним из наиболее важных механизмов детоксикации чужеродных веществ в организме млекопитающих [1]. Синтез глюкуронидов—двухстадийный процесс, который включает, во-первых, биосинтез коферментного донора, уридиндифосфат- α -D-глюкуроновой кислоты (УДФГК), и, во-вторых, перенос посредством УДФ-глюкуронилтрансферазы глюкуронидной части УДФГК на агликон [2]. Образование глюкуронидов происходит в печени и в меньшей степени в почках, желудочно-кишечном тракте и коже.

Глюкурониды чужеродных соединений обладают β -пиранозидной структурой и классифицируются как O-глюкурониды (эфирный, сложноефирный, энольный и гидроксиламиновый типы), S- и N-глюкурониды. Если O- и S-глюкурониды изучены достаточно хорошо, то об N-глюкуронидах сведения практически отсутствуют. Однако имеется целый ряд органических соединений, у которых атом азота может присоединять глюкуронидную часть. Такой атом азота может находиться в амино-, сульфамидной и карбамильной группах или в гетероциклическом азотистом соединении.

В настоящей работе изучена способность ферментных систем белых крыс синтезировать *in vivo* ароматические аминоглюкурониды при внутрибрюшинном введении им ряда 5-замещенных 2-аминобензофенонов. Исследуемые субстраты являются конечными продуктами метаболизма транквилизаторов производных 1,4-бенздиазепина [3,4]. Проведено также сравнение физико-химических свойств веществ с действием на них УДФ-глюкуронилтрансферазы.

М е т о д и к а

Исследуемые соединения синтезированы в нашей лаборатории. Опыты проводили на крысах-самцах массой 180—200 г. Вещества экспериментальным животным вводили в дозе 10 мг/кг в виде твиновой эмульсии. Мочу собирали через 24 и 48 ч после введения соединений. Свободные вещества извлекали из мочи хлороформом. Водную фазу подкисляли 1,5 н. H_2SO_4 до pH 4,7 и инкубировали с β -глюкуронидазой (3000 ед.) в течение 24 ч при 37°C. Освободившиеся после гидролиза агликоны экстрагировались из мочи так же, как и свободные вещества [5]. Соединения идентифицировали сочетанием методов тонкослойной хроматографии, вольт-амперметрии и масс-спектрометрии [6, 7]. Количество вещества определяли полярографически с помощью ртутно-канального электрода на полярографе ППТ-1. С этой целью хлороформные экстракты упаривали досуха, к остатку прибавляли 4 мл диметилформамида и 4 мл ацетатного буфера pH 4,7. В этой среде потенциал полувольты 2-аминобензофенонов в зависимости от заместителя составлял 1,35—1,55 В. Одновременный перенос 4 электронов и незначительная крутизна волны позволяли определять методом классической полярографии большие количества исследуемых веществ. Метод успешно может быть использован при изучении выведения 2-аминобензофенонов с мочой. Для построения калибровочного графика использовали растворы соединений с концентрацией 10—100 мкг/мл. При статистической обработке калибровочного графика было найдено, что ошибка единичного определения для центра кривой составляет 3,34%. В работе также учитывали извлекаемость 2-аминобензофенонов растворителем из мочи.

Значения констант Гаммета (σ_n) заместителя были взяты из литературы [8]. Константы липофильности ($\pi = \lg P$) 2-аминобензофенонов определяли методом разделения в системе октановый спирт — буфер [9]. Основность веществ ($E_{1/2}$) определяли неводным титрованием в метилэтилкетоне.

Полученные данные обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Анализ водной фазы мочи, которая была обработана β -глюкуронидазой, показал, что все 5-замещенные 2-аминобензофеноны с $R = \text{NH}_2$ (I), CH_3 (II), H (III), Cl (IV) в организме белых крыс конъюгируют с глюкуроновой кислотой, образуя соответствующие N-глюкурониды.

Таблица 1

Экскреция с мочой свободных бензофенонов и их аминокглюкуронидов ($n = 8-10$)

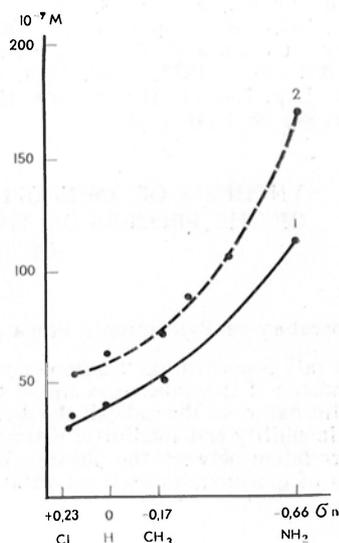
R	Содержание (в нмоль) в моче крыс			
	свободных форм		аминокглюкуронидов	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
NH_2	$116 \pm 10,1$	$181 \pm 17,2$	$53,4 \pm 5,6$	$72,4 \pm 7,7$
CH_3	$534 \pm 62,1$	$678 \pm 81,9$	$113,4 \pm 19,6$	$170 \pm 22,0$
H	$292 \pm 21,0$	$469 \pm 30,2$	$40,3 \pm 6,0$	$65,8 \pm 11,3$
Cl	$78,4 \pm 8,8$	$124 \pm 11,6$	$31,5 \pm 3,2$	$55,3 \pm 4,6$

Таблица 2

Значения констант Гаммета (σ_n), основности ($E_{1/2}$) и липофильности 5-замещенных 2-аминобензофенонов

R	σ_n	$E_{1/2}$	$\pi = \lg P$
NH_2	-0,66	4,91	1,833
CH_3	-0,17	5,86	3,088
H	0	6,57	3,536
Cl	0,23	7,50	3,180

Количество выделившихся с мочой исходных соединений и их глюкуронидов представлено в табл. 1. Как видно из табл. 1, за 24 и 48 ч исходные соединения выводятся из организма экспериментальных животных в неодинаковом количестве. Отмечено наиболее высокое содержание в моче метилзамещенного 2-аминобензофенона (II) и самое низкое — хлорсодержащего 2-аминобензофенона (IV). В этом случае все исследуемые вещества можно расположить в следующем порядке: II > III > I > IV. Глюкуроилконъюгаты же располагаются в ином порядке: II > I > III > IV. Представленные результаты свидетельствуют о том, что выведение из организма белых крыс исследуемых веществ в свободном состоянии, синтез глюкуронидов и их выделение зависят от незначительной модификации структуры молекулы (табл. 2).



Взаимосвязь между количеством образовавшихся аминокглюкуронидов через 24 (1) и 48 (2) ч и константами Гаммета заместителя 2-аминобензофенонов.

По горизонтали — значения констант Гаммета заместителя; по вертикали — концентрация аминокглюкуронидов в моче белых крыс (10^{-7} М).

Сравнение количества свободных 2-аминобензофенонов в моче животных с их электронными и липофильными свойствами указывает на отсутствие какой-либо корреляции между изучаемыми параметрами. Зависимости между количеством образовавшихся глюкуроноидов, с одной стороны, и основностью и липофильностью субстратов УДФ-глюкуронилтрансферазы—с другой, не обнаружено. Однако удовлетворительная зависимость наблюдается при сопоставлении констант Гаммета заместителя 2-аминобензофенонов и количеством образовавшихся N-глюкуроноидов (см. рисунок). Такая корреляция отмечается как при исследовании в течение 24 ч, так и при исследовании в течение 48 ч.

Таким образом, первая стадия метаболических превращений ксенобиотиков — гидроксילирование, катализируемое монооксигеназами, зависит в основном от липофильных свойств субстрата [10, 11], в то время как вторая, в частности N-глюкуронконъюгация, — от их электронных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Williams R. T. Detoxycation Mechanisms. New York, 1959, p. 135.—
2. Парк Д. В. Биохимия чужеродных соединений. М., 1973, с. 92—96.— 3. Богатский А. В., Головенко Н. Я., Андронати С. А. и др.— В кн.: Физиологически активные вещества. Киев, 1975, вып. 7, с. 79.— 4. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Карасева Т. Л. и др.— Фармация, 1977, № 4, с. 39.— 5. Богатский А. В., Головенко Н. Я., Андронати С. А. и др.— В кн.: Фармакология и токсикология. Киев, 1977, вып. 12, с. 16.— 6. Богатский А. В., Андронати С. А., Старовойт И. А. и др.— В кн.: Новости полярографии. Рига, 1975, с. 165.— 7. Богатский А. В., Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г. и др.— В кн.: Всесоюзная конференция по аналитической химии органических соединений. Тезисы докладов. М., 1976, с. 163.— 8. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М., 1976, с. 167.— 9. Смутьский С. П., Богатский А. В., Андронати С. А. и др.— Докл. АН СССР, 1977, т. 23, № 2, с. 369.— 10. Hansch C.— Drug. Metab. Rev., 1972, v. 1, p. 1.— 11. Цырлов И. Б., Ляхович В. В.— Успехи совр. биол., 1977, т. 84, № 1 (4), с. 3.

Поступила 25/X 1977 г.

SYNTHESIS OF AMINOGLUCURONIDES IN RATS. DEPENDENCE OF THE PROCESS ON THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF THE SUBSTRATE

N. Ya. Golovenko

Laboratory of Psychotropic Preparations, I. I. Mechnikov State University, Odessa

In rats 5-substituted 2-aminobenzophenones (R-NH₂; CH₃; H; Cl) formed N-glucuronides. Amounts of free substances and of the glucuronyl-conjugates, excreted with urine, depended on the nature of the radical; the derivatives differed in the values of Hammett's constants, in the lipophilicity and alkalinity. Estimation of Hammett's constants enabled to find a satisfactory correlation between the physico-chemical properties of the derivatives studied and the amounts of glucuronides excreted with urine.

В. Б. Спиричев, Н. В. Блажевич, Н. А. Богословский,
Г. И. Самохвалов, В. М. Авакумов, В. А. Исаева,
А. Л. Поздняков, С. К. Соколова, О. Г. Переверзева,
Л. Д. Рязанцева, С. В. Соколова, Р. Фернандес Регладо

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 1α -ОКСИХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА И ЭРГОКАЛЬЦИФЕРОЛА НА КРЫСАХ

Институт питания АМН СССР, Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт Министерства медицинской промышленности, Москва

Под влиянием однократного введения 0,25 мкг синтетического 1α -оксихолекальциферола (1α ОНД₃) нефрэктомизированным крысам, лишенным витамина D, восстанавливается способность тонких кишок этих животных к активному транспорту кальция против концентрационного градиента, тогда как эргокальциферол в этих условиях биологической активности не проявляет. При введении 1α ОНД₃ в течение 5 дней в дозе 0,025 мкг в день уровень кальция в сыворотке крови крыс, лишенных витамина, нормализуется. При введении в повышенных дозах интактным животным 1α ОНД₃ вызывает переходящую гиперфосфатемию, гиперкальциемию, кальциноз внутренних органов и тканей (почки, сердце, аорта) и гибель части животных. Гиперкальциемическое и кальцинозное действие 1α ОНД₃ в 400 раз превосходит аналогичные эффекты эргокальциферола. ЛД₅₀ для 1α ОНД₃ при 5-кратном пероральном введении составляет 100 мкг/кг в день. Кальциноз тканей развивается при введении 1α ОНД₃ в дозе 10 мкг/кг, а умеренная гиперкальциемия — в дозе 1 мкг/кг или 0,25 мкг на крысу в день, что лишь в 10 раз превосходит физиологическую дозу этого препарата. Эргокальциферол вызывает гиперкальциемию и метастатическую кальцификацию только в дозе 4000 мкг/кг. Высокая биологическая активность 1α ОНД₃ и его токсичность в повышенных дозах свидетельствуют о недопустимости клинического применения этого препарата в дозах, превышающих физиологическую потребность.

Специфические функции витамина D в организме связаны со стимуляцией всасывания кальция и фосфора в тонких кишках [1—3], их реабсорбции в почках [1, 4] и мобилизации из преобразованной костной ткани [1, 5]. Эти функции витамин D выполняет не в том виде, в котором он поступает с пищей или образуется в коже под действием света, а в форме своих активных метаболитов [6—10]. Важнейшим из них является 1,25-диоксихолекальциферол [1,25 (ОН)₂D₃], образующийся в почках из циркуляторной (транспортной) формы витамина D—25-оксихолекальциферола (25ОНD₃), местом образования которого служит печень.

Биологическая активность 1,25 (ОН)₂D₃, оцениваемая по его способности усиливать всасывание кальция в тонких кишках или мобилизацию этого элемента из костной ткани животных, лишенных витамина D, в 5—10 раз превышает активность исходного холекальциферола (витамина D₃) и в 3—5 раз—25ОНD₃ [8, 11].

Нарушение образования 1,25 (ОН)₂D₃ является основной причиной дефектов всасывания кальция, гипокальциемии и костных изменений при хронической почечной недостаточности, врожденном витамин-D-зависимом рахите и гипопаратиреозе [6, 8, 12, 13].

При всех этих патологических состояниях введение 1,25 (ОН)₂D₃, устраняя первичный патогенетический дефект, способствует нормализации кальциевого обмена и устранению костных нарушений [12—15].

Положительный эффект от применения 1,25 (ОН)₂D₃ получен также при гипокальциемии новорожденных [16].

Серьезным препятствием к широкому терапевтическому использованию 1,25(ОН)₂D₃ является сложность его получения. Более доступен синтетический аналог 1,25(ОН)₂D₃— 1α -оксихолекальциферол (1α ОНД₃), обладающий биологической активностью, близкой активности 1,25 (ОН)₂D₃ [17]. Поскольку в молекуле 1α ОНД₃ уже имеется гидроксильная группа в 1α -положении, то его эффективность, подобно 1,25(ОН)₂D₃, не зависит от 1α -

Возможно, что это несоответствие обусловлено различиями условий эксперимента, поскольку в опытах указанных выше авторов [32] соотношение Са : Р в рационе было оптимальным (2 : 1), а в наших экспериментах — сдвинуто в сторону избыточного потребления фосфора (1 : 2), что могло затруднить всасывание кальция в кишечнике [33]. В этих условиях уровень кальция в крови под действием $1\alpha\text{ОНD}_3$ мог нормализоваться не столько за счет усиления его всасывания в кишечнике, сколько за счет усиленной мобилизации из костной ткани, что могло препятствовать ее минерализации. С другой стороны, в цитируемой работе [32] степень минерализации оценивалась таким показателем, как общий вес золы бедренной кости крысы, в то время как в нашей работе были использованы более точные показатели: удельный вес костной ткани и содержание в ней Са и Р на единицу объема. Не исключено, что для минерализации костной ткани необходимо сочетанное действие не только 1,25-дигидроксиэргокальциферола, но и других метаболитов витамина D, которые не могут образоваться из $1\alpha\text{ОНD}_3$.

В табл. 5 представлены данные о влиянии $1\alpha\text{ОНD}_3$ и эргокальциферола на активный транспорт кальция в вывернутых мешочках тонких кишок. Однократное введение 0,25 мкг $1\alpha\text{ОНD}_3$ нефрэктомизированным животным, лишенным витамина D, приводило к почти полному восстановлению способности тонких кишок к всасыванию кальция против концентрационного градиента. Эргокальциферол в этих условиях был неэффективен. Полученные результаты, согласующиеся с данными других исследователей [17], подтверждают, что $1\alpha\text{ОНD}_3$ реализует свое действие на систему всасывания кальция в кишечнике без предварительного гидроксирования в почках. Одновременно полученные данные демонстрируют высокую биологическую активность испытываемого синтетического препарата $1\alpha\text{ОНD}_3$, что открывает возможность его использования для коррекции нарушений минерального обмена, обусловленных дефектом синтеза 1,25 (ОН) $_2$ D $_3$ в почках при хронической почечной недостаточности, врожденном витамин-D-зависимом рахите, гипопаратиреозе и других патологических состояниях.

Токсическое действие $1\alpha\text{ОНD}_3$. Основными проявлениями токсического действия витамина D в дозах, существенно превышающих физиологическую потребность, служат гиперкальциемия и кальциноз внутренних органов и тканей сердца, почек, артериальных сосудов, приводящий к нарушению их жизненно важных функций, а в наиболее тяжелых случаях к гибели организма [22, 34]. Эти нарушения лежат в основе клинической и патоморфологической картины D-гипервитаминоза — серьезного осложнения, часто возникающего при использовании нефизиологически высоких доз витамина D в профилактических и лечебных целях [35]. Наиболее ранним признаком интоксикации витамином D является увеличение концентрации фосфора в сыворотке крови.

Это увеличение обнаруживается уже через 18—24 ч после однократного введения витамина D, тогда как концентрация кальция существенно возрастает лишь к 3—4-му дню, а кальциноз внутренних органов и тканей достигает выраженных значений через 5—7 дней после начала введения витамина D [34].

Все эти изменения были обнаружены и при сравнительном изучении токсического действия эргокальциферола и $1\alpha\text{ОНD}_3$ (табл. 6). Увеличение концентрации фосфора в сыворотке крови наблюдалось при однократном введении эргокальциферола в дозах от 25 до 1000 мкг на животное, что соответствует 100—4000 мкг, или 4000—160 000 МЕ витамина D на 1 кг массы тела. Уровень кальция после однократного введения эргокальциферола даже в дозе 4000 мкг/кг практически не менялся. Гиперкальциемия развивалась лишь после 3 дней введения эргокальциферола в указанной дозе. В той же дозе витамин D $_2$ вызывал метастатическую кальцификацию почек, сердца и аорты (табл. 7). При введении эргокальциферола в более низких дозах, в том числе и в дозе 250 мкг на животное в день (1 мг, или

приведен в табл. 1—3. Содержание кальция в рационе с учетом казеина и сслевых добавок составляло 0,6%, фосфора — 1,2%. Контрольным животным, получавшим тот же рацион, 3 раза в неделю перорально давали по 0,1 мл раствора эргокальциферола с концентрацией 240 МЕ/мл, что обеспечивало поступление 10 МЕ (0,25 мкг) эргокальциферола на крысу в день.

Изучение влияния эргокальциферола и $1\alpha\text{ОНD}_3$ на активный транспорт ^{45}Ca в тонких кишках нефрэктомизированных крыс, лишенных витамина D. Крыс, находившихся в течение 4 нед на рационе, лишенном витамина D, подвергали двусторонней нефрэктомии под эфирным наркозом. За 16 ч до операции животных лишали пищи, чтобы снизить степень уремии после удаления почек. Это обеспечивало выживание животных в течение 20—24 ч после операции. Оперированным животным, оправившимся от наркоза, вводили зондом в желудок 0,25 мкг эргокальциферола или $1\alpha\text{ОНD}_3$ в 0,1 мл пропиленгликоля. Через 18 ч животных декапитировали и исследовали способность изолированного отрезка тонких кишок к всасыванию кальция против концентрационного градиента методом вывер-

Т а б л и ц а 2

Состав солевой смеси, используемой в рационе для создания недостаточности витамина D у крыс

Соль	Содержание в смеси, %
KCl	57,7
NaCl	20,9
MgSO ₄	17,9
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3,22
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,078
NaF	0,113
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,004
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,057
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,44
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,005
KI	0,01

нутого мешочка *in vitro* [25]. С этой целью отрезок первых 5 см тонких кишок, вывернутый слизистой оболочкой наружу и изолированный лигатурами, инкубировали 1½ ч при 37°C в аэрируемой карбогенной смеси (96% O₂+4% CO₂) питательной среде, содержащей $^{45}\text{CaCl}_2$, заполняя отрезок кишки 0,5 мл среды того же состава (NaCl — 125 мМ, фруктоза — 10 мМ, трис-НСl-буфер рН 7,4—30 мМ, $^{45}\text{CaCl}_2$ — в количестве, достаточном, для того чтобы 0,1 мл среды давал 1000—5000 имп/мин, CaCl₂ — до общей концентрации Ca с учетом ^{45}Ca — 0,25 мМ). Интенсивность активного транспорта выражали как отношение радиоактивности 0,1 мл среды внутри мешочка к радиоактивности того же объема наружной среды после инкубации (Ca_в: Ca_н).

Изучение влияния эргокальциферола и $1\alpha\text{ОНD}_3$ на концентрацию Ca и P_н в сыворотке крови и состав костной ткани крыс, лишенных витамина D. $1\alpha\text{ОНD}_3$ и эргокальциферол вводили крысам, лишенным в течение 4 нед витамина D, в дозе 0,025 или 0,25 мкг в день в 0,1 мл пропиленгликоля перорально в течение 5 дней. Животных декапитировали через 24 ч после последнего введения. Концентрацию кальция в сыворотке крови определяли комплексонометрическим титрованием 0,01 М ЭДТА в присутствии индикатора флуорескона [26], концентрацию (P_н) — по Фиске — Суббароу в модификации Кинга [27].

Изучение состава костной ткани. Диафизы бедренной кости, тщательно отмытые от костного мозга и высушенные струей воздуха, взвешивали на торсионных весах на воздухе и под водой с тарированным грузом. Объем диафиза рассчитывали по разности между его весом на воздухе и под водой [28]. После этого диафиз обезжиривали в 2 сменах хлороформа со спиртом (1 : 1), высушивали до постоянного веса при 100°C и взвешивали. Удельный вес рассчитывали как отношение сухого веса кости к ее объему. Диафизы растворяли в 2 мл 18% HCl на кипящей водяной бане в течение 2 ч [29]. Содержание Ca и P_н в растворе определяли, как указано выше [26, 27], оксипролина — методом Бергмана [30] после 12-часового гидролиза в 6 н. HCl при 100°C и рассчитывали в миллиграммах на 1 см³ объема костной ткани.

Т а б л и ц а 3

Смесь водорастворимых витаминов, используемая в рационе для создания недостаточности витамина D у крыс

Витамин	Содержание в смеси, %
Тиамин	0,5
Рибофлавин	0,5
Пиридоксин	0,5
Пантотенат кальция	2,8
Никотиновая кислота	2,0
Фолиевая кислота	0,02
Цианокобаламин	0,002
Биотин	0,01
Викасол	0,1
Глюкоза	93,6 (до 100)

Примечание. Из жирорастворимых витаминов в рацион включают витамин А (5 мг ретинилацетата на 1 кг рациона), который добавляют в подсолнечное масло. Витамин Е к рациону не добавляют, так как он в достаточном количестве содержится в подсолнечном масле. Витамин К вводят в виде викасола в смеси водорастворимых витаминов.

Т а б л и ц а 4

Влияние 1α -оксиколекальциферола и эргокальциферола на концентрацию Са и Р в сыворотке крови и состав костной ткани крыс, лишенных витамина D (введение в течение 5 дней)

Ткань	Контроль	Витамин D	1α -оксиколекальциферол		Эргокальциферол	
			0,025 мкг	0,25 мкг	0,025 мкг	0,25 мкг
Сыворотка крови:						
Са, мг на 100 мл	9,6±0,1 (11)	8,6±0,08 (19) $P_1 < 0,01$	9,6±0,2 (5) $P_2 < 0,02$	9,5±0,2 (6)	9,0±0,1 (6)	9,2±0,07 (19)
Р _н , мг на 100 мл	9,0±0,2 (11)	10,1±0,3 (16)	9,5±0,6 (5)	9,4±0,9 (5)	8,7±0,07 (5)	9,5±0,2 (14)
Костная ткань (диафизы):						
Удельный вес, г сухой ткани на 1 см ³	1,62±0,02 (4)	1,39±0,03 (18) $P_1 < 0,001$	1,36±0,1 (5)	1,33±0,08 (6)	1,45±0,07 (6)	1,5±0,02 (16) $P_2 < 0,01$
Са, мг/см ³	384±8 (11)	343±14 (14) $P_1 < 0,02$	331±42 (5)	344±34 (6)	392±21 (6) $P_2 < 0,1 > 0,05$	375±9 (16) $P_2 < 0,05$
Р, мг/см ³	184±4 (11)	158±5 (14) $P_1 < 0,01$	169±17 (5)	154±7 (6)	176±8 (6) $P_2 < 0,1 < 0,05$	174±3 (16) $P_2 < 0,02$
Оксипролин, мг/см ³	37,7±1,4 (11)	34,2±1,3 (14) $P_1 < 0,1 > 0,05$	36,8±3,4 (5)	35,5±2,3 (5)	37,5±2 (6)	37,1±1,0 (16)

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 5 P_1 вычислено по сравнению с контролем, P_2 — по сравнению с группой крыс, лишенных витамина D. В скобках указано количество животных.

Изучение токсического действия $1\alpha\text{ОНD}_3$ и эргокальциферола. Исследование было выполнено на крысах линии Вистар с исходной массой 230—250 г, получавших искусственный рацион следующего состава (в процентах): казеин — 22, крахмал — 60,7, подсолнечное масло — 10, фильтровальная бумага — 3, солевая смесь (см. ниже) — 4,0, смесь водорастворимых витаминов (см. табл. 3), холина хлорид — 0,2. Состав солевой смеси (в г) по [31] с некоторыми модификациями: NaCl — 58,5; KH_2PO_4 — 163,3, MgSO_4 — 24,1, CaCO_3 — 160,2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 11,1, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 1,87, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,23, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,2, $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,01, NaF — 0,21, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 0,047, KI — 0,332. Содержание Ca в рационе 0,65%, фосфора 0,50%. Животных переводили на искусственный рацион за 2 нед до начала введения исследуемых препаратов. $1\alpha\text{ОНD}_3$ и эргокальциферол давали крысам перорально в пропиленгликоле или смеси спирта с пропиленгликолем (1:3, 1:1) в течение 5 дней в дозах 0,25; 2,5; 25; 250 и 1000 мкг на крысу в день, что соответствовало 1, 10, 100, 1000 и 4000 мкг/кг. Животных забивали через 24 ч после первого введения исследуемых препаратов, а также на 4-е и 7-е сутки эксперимента. У забитых животных исследовали концентрацию Ca и P в сыворотке крови [26, 27]. О степени кальциноза внутренних органов судили по накоплению Ca в почках, аорте и сердце. С этой целью указанные органы высушивали до постоянного веса, сжигали при 600°C, золу растворяли в 2 н. HCl и определяли содержание Ca комплексонометрическим титрованием. Удельный вес костей, содержание в них Ca, P и оксипролина определяли, как описано выше. У погибших животных брали на исследование внутренние органы и кости.

Результаты и обсуждение

Биологическая активность $1\alpha\text{ОНD}_3$. Пребывание животных на рационе, лишенном витамина D, сопровождалось развитием недостаточности этого витамина, выразившейся в снижении концентрации кальция в сыворотке крови до $8,6 \pm 0,08$ мг на 100 мл при норме $9,6 \pm 0,1$ мг на 100 мл (табл. 4) и почти полной утрате способности тонких кишок к активному транспорту кальция против концентрационного градиента (табл. 5). Одновременно наблюдались уменьшение удельного веса костной ткани и снижение содержания в ней кальция и фосфора при отсутствии достоверных изменений содержания оксипролина (см. табл. 4). Эти изменения свидетельствуют о нарушении минерализации костной ткани при недостаточности витамина D.

Под влиянием введения животным $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозах 0,025 и 0,25 мкг в день в течение 5 дней полностью нормализовалась концентрация кальция в сыворотке крови. При введении эргокальциферола в тех же дозах полной нормализации уровня кальция не наступало. Эти данные показывают, что биологическая активность $1\alpha\text{ОНD}_3$, оцениваемая по увеличению концентрации кальция в крови крыс, лишенных витамина D, по крайней мере в 10 раз превышает активность эргокальциферола. В то же время введение $1\alpha\text{ОНD}_3$ даже в дозе 0,25 мкг в день не вызывало улучшения минерализации костной ткани, тогда как под влиянием эргокальциферола полностью восстанавливались нормальный удельный вес диафизов и содержание в них основных минеральных компонентов.

Эти данные не согласуются с результатами исследований других авторов [32], показавших в опытах на крысах, что биологическая активность $1\alpha\text{ОНD}_3$, оцениваемая как по нормализации уровня кальция в сыворотке крови, так и по усилению минерализации костной ткани, в 2—5 раз превышает активность холекальциферола.

Таблица 5
Влияние 1α -оксихолекальциферола и эргокальциферола на активный транспорт Ca в тонких кишках нефрэктомизированных крыс, лишенных витамина D (одноразовое введение 0,25 мкг препарата)

	Активный транспорт ^{45}Ca ($\text{Ca}_B : \text{Ca}_H$)
Контроль	$3,07 \pm 0,43$ (7)
— Витамин D	$1,55 \pm 0,08$ (8) $P_1 < 0,01$
+ 1α -оксихолекальциферол	$2,48 \pm 0,28$ (7) $P_2 < 0,01$
+ эргокальциферол	$1,36 \pm 0,11$ (7)

гидроксилазы почек. Это открывает широкие возможности использования $1\alpha\text{ОНD}_3$ вместо $1,25(\text{ОН})_2\text{D}_3$ при всех перечисленных выше нарушениях минерального обмена, обусловленных дефектом образования $1,25(\text{ОН})_2\text{D}_3$ [13, 15, 18—21].

Необходимым условием внедрения $1\alpha\text{ОНD}_3$ в клиническую практику является его всестороннее фармакологическое испытание, включающее изучение как биологической активности, так и токсического действия. Последнее обстоятельство особенно важно, поскольку витамин D в дозах, превышающих физиологическую потребность, дает выраженный токсический эффект [22], а токсичность $1\alpha\text{ОНD}_3$

может существенно превышать токсичность исходного витамина [23].

В настоящей работе представлены результаты сравнительного изучения биологической активности и токсичности эргокальциферола (витамина D_2) и $1\alpha\text{ОНD}_3$, полученного на основе оригинальной схемы синтеза во Всесоюзном научно-исследовательском витаминном институте (старший научный сотрудник Н. А. Богословский).

Выбор эргокальциферола для сравнения с $1\alpha\text{ОНD}_3$ обусловлен тем, что эргокальциферол значительно более широко используется в педиатрии и клинической практике, чем холекальциферол (витамин D_3).

В качестве основных показателей биологической активности были изучены влияние однократного вве-

дения физиологических доз эргокальциферола и $1\alpha\text{ОНD}_3$ нефрэктомизированным крысам, лишенным витамина D, на активный транспорт кальция вывернутыми отрезками тонких кишок *in vitro*, а также влияние введения этих соединений в течение 5 дней животным, лишенным витамина D, на концентрацию кальция и фосфора в сыворотке крови, удельный вес костной ткани, содержание в ней кальция, фосфора и оксипролина.

Для сравнительной оценки токсичности повышенных доз эргокальциферола и $1\alpha\text{ОНD}_3$ была использована апробированная ранее [24] модель введения крысам в течение 5 дней возрастающих доз исследуемых препаратов с определением концентрации фосфора и кальция в сыворотке крови через 24 ч после первого введения, уровня кальция в крови после 3 дней введения, концентрации кальция и фосфора в сыворотке крови, степени кальциноза аорты, почки и миокарда на 7-й день эксперимента. Одновременно проводились патоморфологическое и гистологическое исследования животных, получавших повышенные дозы изучаемых препаратов.

М е т о д и к а

Создание экспериментальной недостаточности витамина D. Крысы-отъемыши популяции Вистар с исходной массой 45—50 г содержали в течение 4—5 нед в индивидуальных клетках в затемненном помещении на искусственном рационе, состав которого

Т а б л и ц а 1
Состав рациона для создания недостаточности витамина D у крыс

Составная часть	Содержание, %
Казеин, отмытый от витамина D	22
Крахмал	32,2
Глюкоза	26,5
Подсолнечное масло с витамином А	6
Метилцеллюлоза или фильтровальная бумага	3
Солевая смесь (см. табл. 2)	2
CaCO_3	1,4
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	3,86
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,58
Смесь водорастворимых витаминов (см. табл. 3)	0,1
Цистеин	0,2
Холина хлорид	0,2

П р и м е ч а н и е. Отмывка казеина: измельченный казеин промывают 2—3 раза водой, растворяют добавлением NH_4OH , пересаждают подкислением 2 н. HCl до pH 5,0 при 30°C, промывают 2—3 раза водой, тщательно отжимают, экстрагируют 2 раза смесью хлороформ — метанол (2 : 1) при комнатной температуре с периодическим перемешиванием и 2 раза кипятят со спиртом по 18—20 ч. Отфильтрованный казеин сушат при 80°C и измельчают.

Т а б л и ц а 6

Влияние повышенных доз 1 α -оксиколекальциферола и эргокальциферола на концентрацию Са и Р в сыворотке крови крыс

	Доза препарата		Через 24 ч после однократного введения препарата		Через 3 сут после начала ежедневного введения препарата
	мкг на животное	мкг/кг	Р, мг%	Са, мг%	
Контроль (7)	—	—	9,0 \pm 0,4	10,0 \pm 0,07	10,0 \pm 0,1
1 α -оксиколекальциферол (7)	0,25	1	9,1 \pm 0,1	10,0 \pm 0,2	11,1 \pm 0,3 <i>P</i> <0,05
	2,5	10	10,8 \pm 0,3 <i>P</i> <0,01	10,7 \pm 0,2 <i>P</i> <0,01	11,8 \pm 0,4 <i>P</i> <0,01
	25	100	11,8 \pm 0,4 <i>P</i> <0,001	11,3 \pm 0,3 <i>P</i> <0,01	—
	250	1000	9,1 \pm 0,4	12,5 \pm 0,2 <i>P</i> <0,001	—
	1000	4000	9,5 \pm 0,3	12,4 \pm 0,4 <i>P</i> <0,001	—
Эргокальциферол (7)	2,5	10	9,1 \pm 0,2	9,5 \pm 0,2	10,6 \pm 0,5
	25	100	11,2 \pm 0,3 <i>P</i> <0,01	10,2 \pm 0,2	10,0 \pm 0,1
	250	1000	11,5 \pm 0,5 <i>P</i> <0,01	9,7 \pm 0,2	10,6 \pm 0,2
	1000	4000	11,4 \pm 0,5 <i>P</i> <0,01	9,7 \pm 0,2	13,7 \pm 0,3 <i>P</i> <0,001

Примечание. Здесь и в табл. 7 *P* вычислено по сравнению с контролем.

Т а б л и ц а 7

Кальциноз внутренних органов крыс при введении повышенных доз 1 α -оксиколекальциферола и эргокальциферола

	Доза препарата		Са, мг на 1 кг сухой ткани		
	мкг на животное	мкг/кг	аорта	сердце	почка
Контроль	—	—	2,8 \pm 0,4 (7)	1,2 \pm 0,4 (4)	1,2 \pm 0,1 (7)
1 α -оксиколекальциферол	0,25	1	3,1 \pm 0,3 (7)	1,0 \pm 0,02 (4)	1,4 \pm 0,1 (7)
	2,5	10	9,1 \pm 4,6 (7) 4/7	1,3 \pm 0,3 (4)	23,0 \pm 0,2 (7) <i>P</i> <0,001
	25,0	100	11,2 \pm 3,2 (6) <i>P</i> <0,05	8,5 \pm 2,5 (7) <i>P</i> <0,02	20,5 \pm 6,1 (8) <i>P</i> <0,01
	250,0	1000	19,3 \pm 3,3 (5) <i>P</i> <0,001	12,4 \pm 3,8 (5) <i>P</i> <0,05	43,4 \pm 9,6 (4) <i>P</i> <0,002
	1000,0	4000	7,4 \pm 1,4 (7) <i>P</i> <0,01	17,7 \pm 3,8 (7) <i>P</i> <0,002	13,8 \pm 3,0 (9) <i>P</i> <0,001
Эргокальциферол	2,5	10	2,7 \pm 0,4 (7)	1,0 \pm 0,1 (4)	1,4 \pm 0,2 (7)
	25	100	2,5 \pm 0,2 (7)	1,4 \pm 0,1 (4)	1,6 \pm 0,2 (7)
	250	1000	2,1 \pm 0,2 (8)	1,4 \pm 0,2 (5)	1,8 \pm 0,2 (8)
	1000,0	4000	18,4 \pm 6,9 (10) <i>P</i> <0,05	3,1 \pm 1,1 (7) 2/7	9,8 \pm 2,3 (10) <i>P</i> <0,002

Примечание. В числителе — число животных с кальцификацией исследуемого органа, в знаменателе — общее число животных в группе.

40 000 МЕ/кг), гиперкальциемия и кальциноз внутренних органов и тканей не развивались. Гибель животных от высоких доз витамина D_2 не наблюдалась, в том числе и в группе животных, получавших эргокальциферол в самой высокой дозе.

Введение повышенных доз $1\alpha\text{ОНD}_3$ вызывало аналогичные изменения, однако токсичность $1\alpha\text{ОНD}_3$ была значительно более высокой и отличалась рядом качественных особенностей.

Прежде всего $1\alpha\text{ОНD}_3$ обнаружил выраженное летальное действие. При его введении в ежедневной дозе 4000 мкг/кг на 3-й день погибли 30 % животных, а к 4-му дню — 100 %. Введение $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозе 250 мкг на крысу в день также вызвало гибель всех животных к 5-му дню эксперимента. При введении $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозе 25 мкг летальность составила к 5-му дню около 60 %. В дозе 2,5 мкг и менее $1\alpha\text{ОНD}_3$ при 5-кратном введении гибели животных не вызывал. Таким образом, ЛД_{50} при 5-кратном введении $1\alpha\text{ОНD}_3$ крысам составила около 25 мкг на крысу, или 100 мкг на 1 кг массы в день.

В исследованиях других авторов [23] при введении $1\alpha\text{ОНD}_3$ крысам в течение 14 дней ЛД_{50} составила 340—720 мкг/кг, что в несколько раз превышает полученную нами величину. Причина этих различий может заключаться в том, что испытание токсического действия эргокальциферола и $1\alpha\text{ОНD}_3$ проводилось нами на рационе с относительно высоким содержанием Са и Р (соответственно 0,65 и 0,50 %), усиливающим проявления токсического действия этих соединений и развитие метастатической кальцификации. Полученная нами величина ЛД_{50} для $1\alpha\text{ОНD}_3$ в 1000 раз превышает его эффективную физиологическую дозу (0,025 мкг на крысу в день). Значительно более высокая токсичность $1\alpha\text{ОНD}_3$ сочеталась с более интенсивным воздействием на концентрацию Са и P_n в сыворотке крови, а также на развитие метастатической кальцификации внутренних органов и тканей.

Концентрация P_n в сыворотке крови повышалась после однократного введения $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозе 2,5 мкг на крысу, тогда как для аналогичного эффекта от эргокальциферола требовалась в 10 раз более высокая доза (см. табл. 6). При введении $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозах 250 и 1000 мкг концентрация P_n в сыворотке крови через 24 ч после введения находилась в пределах нормы. Это может быть связано с тем обстоятельством, что гиперфосфатемия при введении высоких доз витамина D носит кратковременный, преходящий характер. Уже через 2 сут концентрация фосфора в крови возвращается к норме, а в дальнейшем даже снижается [34]. В связи с этим можно полагать, что при введении $1\alpha\text{ОНD}_3$ в высоких дозах концентрация P_n в сыворотке крови достигает максимума в более ранний период времени и к моменту первого исследования (через 24 ч после введения) успевает нормализоваться.

$1\alpha\text{ОНD}_3$ оказывает также значительно более выраженное гиперкальциемическое действие. Если однократное введение эргокальциферола даже в самой высокой из использованных доз (1000 мкг на крысу) не вызывало увеличения концентрации Са в сыворотке крови через 24 ч после введения, то $1\alpha\text{ОНD}_3$ вызывал гиперкальциемию в дозах от 2,5 до 1000 мкг. При введении $1\alpha\text{ОНD}_3$ в течение 3 дней гиперкальциемический эффект наблюдался уже от дозы 0,25 мкг, тогда как эргокальциферол был эффективен только в дозе 1000 мкг. Таким образом, по гиперкальциемическому действию $1\alpha\text{ОНD}_3$ в 400 раз более активен, чем эргокальциферол, а его доза, способная вызывать гиперкальциемию (0,25 мкг), лишь в 10 раз превышает физиологическую (0,025 мкг).

Способность $1\alpha\text{ОНD}_3$ индуцировать метастатическую кальцификацию внутренних органов является также значительно более выраженной, чем таковая эргокальциферола (см. табл. 7). Если эргокальциферол вызывал кальциноз почки и аорты только в дозе 1000 мкг на крысу в день, то $1\alpha\text{ОНD}_3$ вызывал кальциноз аорты в дозе 25 мкг, а почки — в дозе 2,5 мкг. Таким образом, по кальцинозному действию $1\alpha\text{ОНD}_3$ также в 400 раз более

активен, чем эргокальциферол. Минимальная доза $1\alpha\text{ОНD}_3$, способная вызывать кальциноз почек при введении в течение 5 дней (2,5 мкг на крысу в день), в 100 раз превышает его физиологическую дозу.

Кальцинозное действие $1\alpha\text{ОНD}_3$ имеет некоторые качественные особенности. Если при введении эргокальциферола в первую очередь страдают почки и аорта, а сердце оказывается затронутым метастатической кальцификацией лишь в незначительной степени (см. табл. 7), то $1\alpha\text{ОНD}_3$ вызывает исключительно тяжелый кальциноз сердца, что позволяет говорить о значительной более высокой кардиотоксичности этого препарата по сравнению с эргокальциферолом. Степень кальциноза почек, вызываемого $1\alpha\text{ОНD}_3$, также значительно превосходит глубину поражения этого органа при введении эргокальциферола.

Т а б л и ц а 8

Влияние повышенных доз 1α -оксиколекальциферола и эргокальциферола на удельный вес и состав костной ткани крыс (диафизы)

Препарат, доза, мкг/кг (в скобках число животных)	Удельный вес, г/см ³	Са, мг/см ³	Р, мг/см ³	Оксипролин, мг/см ³
Контроль (7)	1,57±0,02	387±17	210±7	34,2±1,6
1α -оксиколекальциферол:				
1 (7)	1,67±0,03 $P_1 < 0,02$	409±18	228±8	37,6±1,3
10 (7)	1,63±0,05	402±19	227±11	37,6±1,5
100 (8)	1,51±0,04 $P_3 < 0,01$	368±25	212±4	37,5±1,0
1000 (8)	1,60±0,06	358±21	199±13	29,4±0,7 $P_3 < 0,02$
4000 (12)	1,64±0,02	373±11	222±8	38,9±1,2
Эргокальциферол:				
10 (7)	1,60±0,02	397±17	211±6	35,3±1,4
100 (7)	1,67±0,03 $P_1 < 0,02$	386±13	227±6	35,6±0,7
1000 (8)	1,60±0,03	370±11	218±9	34,8±1,5
4000 (10)	1,58±0,04 $P_3 > 0,05$	362±11	217±10	29,0±0,9 $P_1 < 0,02$

Примечание. P_1 вычислено по сравнению с контролем, P_2 — по сравнению с группой крыс, получавших $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозе 1 мкг/кг, P_3 — по сравнению с группой крыс, получавших эргокальциферол в дозе 100 мкг/кг.

Минимальная доза $1\alpha\text{ОНD}_3$, которая при введении в течение 5 дней вызывала гиперкальциемию и кальциноз почек, составила в наших опытах 2,5 мкг на крысу в день, что соответствует 10 мкг на 1 кг массы животного. Эта величина хорошо коррелирует с минимальной дозой 12,5 мкг/кг, которая, по данным японских исследователей [23], при введении в течение 30 дней крысам вызывала гиперкальциемию, увеличение экскреции Са и снижение экскреции Р_н с мочой, гистологические изменения в тканях и размягчение скелета. Введение $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозе 2,5 мкг/кг в течение 30 дней, по данным тех же авторов [23], не вызывало токсического эффекта, хотя и приводило к увеличению экскреции Са с мочой. По нашим данным, введение $1\alpha\text{ОНD}_3$ даже в дозе 1 мкг/кг (0,25 мкг на крысу в день) в течение 5 дней хотя и не приводит к кальцинозу внутренних органов, однако может вызывать умеренную гиперкальциемию.

В табл. 8 представлены данные о влиянии повышенных доз $1\alpha\text{ОНD}_3$ и эргокальциферола на удельный вес костной ткани, содержание в ней Са, Р и оксипролина. При введении $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозе 1 мкг/кг, превышающей физиологическую в 10 раз, достоверно увеличивается удельный вес костной ткани, что могло быть обусловлено усилением процессов минерализации.

При дальнейшем увеличении дозы $1\alpha\text{ОНD}_3$ до 10 мкг/кг, особенно до 100 мкг/кг, удельный вес костной ткани снижается, что может указывать на ее деминерализацию. Это согласуется с данными японских авторов о размягчении скелета у крыс, получавших $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозе 12,5—50 мкг/кг в течение 30 дней [23], а также об усилении рассасывания костной ткани у людей при введении 25 мкг $1\alpha\text{ОНD}_3$ [21]. Сходная тенденция прослеживается при анализе данных о содержании Са, Р и оксипролина в костной ткани (см. табл. 8).

Отсутствие снижения удельного веса и содержания минеральных компонентов костной ткани при введении $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозе 4000 мкг/кг, по-видимому, связано с тем, что животные этой группы погибли на 3—4-й дни эксперимента, когда изменения костной ткани еще не были выражены в значительной степени.

Сходные изменения наблюдались и при введении повышенных доз эргокальциферола: увеличение удельного веса костной ткани от дозы 100 мкг/кг, превышающей физиологическую потребность в этом витамине в 100 раз, и снижение удельного веса при увеличении дозы до 4000 мкг/кг, вызывающей гиперкальциемию и кальциноз внутренних органов и тканей. Действие эргокальциферола на костную ткань значительно уступает действию $1\alpha\text{ОНD}_3$.

$1\alpha\text{ОНD}_3$, в дозе, вызывающей увеличение удельного веса костной ткани, не приводит к кальцинозу внутренних органов, хотя и обуславливает умеренную гиперкальциемию. В то же время снижение удельного веса костной ткани при введении более высоких доз $1\alpha\text{ОНD}_3$ сопровождается гиперкальциемией и кальцинозом. То же относится и к действию витамина D_2 в повышенных дозах. Эти данные свидетельствуют, что основным источником кальция, откладывающегося во внутренних органах и тканях при введении чрезмерных доз $1\alpha\text{ОНD}_3$ или эргокальциферола, является кальций, вымываемый из костной ткани.

Значительно более высокая токсичность $1\alpha\text{ОНD}_3$ по сравнению с эргокальциферолом, как и его более высокая биологическая активность, обусловлена тем, что $1\alpha\text{ОНD}_3$ является структурным аналогом действующей формы витамина D — $1\alpha,25$ -диоксихолекальциферола. Образование этого метаболита в почках строго регулировано в пределах, необходимых для поддержания гомеостаза кальция [6,7, 10], что в определенной степени предотвращает возможность его избыточного образования при введении в организм чрезмерных количеств исходного холе- или эргокальциферола. $1\alpha\text{ОНD}_3$ превращается в $1\alpha,25$ -диоксихолекальциферол путем введения гидроксильной группы в 25-е положение в печени в обход системы, регулирующей физиологическое образование $1\alpha,25$ -диоксихолекальциферола в почках. В связи с этим при введении $1\alpha\text{ОНD}_3$ в дозах, превышающих физиологическую потребность, образование $1\alpha,25$ -диоксихолекальциферола может возрастать в более значительных пределах, чем при введении высоких доз эрго- или холекальциферола. Кроме того, в отличие от исходного витамина D $1\alpha\text{ОНD}_3$ обладает способностью, подобно $1\alpha,25$ -диоксихолекальциферолу, оказывать непосредственное действие на органы-мишени, о чем свидетельствуют данные по его связыванию со специфическим рецептором $1\alpha,25$ -диоксихолекальциферола в цитозоле слизистой оболочки тонких кишок [36], а также о ресорбирующем действии этого соединения на костную ткань куриного эмбриона *in vitro* [37].

Высокая токсичность $1\alpha\text{ОНD}_3$ подчеркивает недопустимость его применения в дозах, превышающих физиологическую потребность, составляющую для человека не более 1—2 мкг в сутки [13]. Назначение 1α -осихолекальциферола должно быть строго ограничено узким кругом патологических состояний, при которых оно патогенетически оправдано. $1\alpha\text{ОНD}_3$ должен применяться в условиях непрерывного контроля за уровнем кальция в сыворотке крови и немедленно отменяться при малейших признаках гиперкальциемии.

В то же время следует подчеркнуть, что высокая токсичность избыточных количеств $1\alpha\text{OHD}_3$ не должна служить препятствием к его применению в физиологических дозах при хронической почечной недостаточности, врожденном витамин-D-зависимом рахите, гипопаратиреозе и ряде других патологических состояний, при которых его применение оказывается единственным надежным средством коррекции нарушений фосфорно-кальциевого обмена.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Luca H. F.— «Vitam. a. Horm.», 1967, v. 25, p. 315—336.— 2. Waserman R. H.— «Calcif. Tissue Res.», 1968, v. 2, p. 301—313.— 3. Бауман В. К.— В кн.: Физиология всасывания. Л., 1977, с. 152—222.— 4. Reupolds J. J.— «Biochem. Soc. Spec. Publ.», 1974, N 3, p. 91—102.— 5. Puschett J. B., Fernandez P. C. et al.— «Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)», 1972, v. 141, p. 379—384.— 6. De Luca H. F.— «Am. J. Med.», 1975, v. 58, p. 39—47.— 7. Idem.— «J. Lab. clin. Med.», 1976, v. 87, p. 7—26.— 8. Norman A. W., Henry H.— «Recent. Progr. Hormone Res.», 1974, v. 30, p. 431—473.— 9. Бауман В. К.— «Прикладная биохим.», 1972, № 2, с. 131—140.— 10. Спиричев В. Б.— «Казанск. мед. ж.», 1976, № 5, с. 406—419.— 11. Omdahl J. L., De Luca H. F.— «Physiol. Rev.», 1973, v. 53, p. 327—332.— 12. Fraser D., Koosch S. W.— «New Engl. J. Med.», 1973, v. 289, p. 817—822.— 13. Balsani S., Garabedian M. et al.— «Pediat. Res.», 1975, v. 9, p. 586—593.— 14. Brickman A. S., Coburn J. W., Massry S. G. et al.— «Ann. intern. Med.», 1974, v. 80, p. 161—168.— 15. Neer R. M., Holick M. F., De Luca H. F. et al.— «Metabolism», 1975, v. 24, p. 1403—1413.— 16. Koos Sang Whay, Fraser D., Toon R. et al.— «Lancet», 1976, v. 2, p. 1105—1107.— 17. Holick M. F., Semmler E. J., Schnoes H. K. et al.— «Science», 1973, v. 180, p. 190—191.— 18. Chalmers T. M. et al.— «Lancet», 1973, v. 2, p. 696.— 19. Coburn J. W., Hartenbower D. L., Brickman A. S.— «Am. J. clin. Nutr.», 1976, v. 29, p. 1283—1299.— 20. Arita K., Tsuda T. et al.— «Endocr. jap.», 1977, v. 24, p. 207—212.— 21. Феасок М., Gallagher J. C., Nordin B. E.— «Lancet», 1974, v. 1, p. 385—389.— 22. Спиричев В. Б.— В кн.: Витамины. Вып. 6. Киев, 1971, с. 64—91.— 23. Makita Tokutaro, Uotani Yasuhiro et al.— «Toxicol. appl. Pharmacol.», 1976, v. 36, p. 323—329.— 24. Спиричев В. Б. Биохимические механизмы D-гипервитаминоза. Автореф. дис. докт. М., 1977.— 25. Martin D. L., De Luca H. F.— «Am. J. Physiol.», 1969, v. 216, p. 1351.— 26. Вичев Е. П., Каракашов А. В.— «Вопр. мед. химии», 1960, № 4, с. 435.— 27. King E. J.— «Biochem. J.», 1932, v. 26, p. 292.— 28. Calkins E. et al.— «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1956, v. 64, p. 410—423.— 29. Puche R. C. et al.— «Calcif. Tissue Res.», 1976, v. 20, p. 105—119.— 30. Bergman J., Loxley R.— «Analyt. Chem.», 1963, v. 35, p. 1961.— 31. Jones J., Foster C.— «J. Nutr.», 1942, v. 24, p. 245.— 32. Holick M. F., Kasten-Schraufrogel P., Tavela T. et al.— «Arch. Biochem.», 1975, v. 166, p. 63—66.— 33. Fournier P., Dupuis J.— «J. Physiol. (Paris)», 1975, v. 70, p. 479—491.— 34. Спиричев В. Б.— «Педиатрия», 1973, № 11, с. 30—36.— 35. Барлыбаева Н. А., Струков В. И. Гипервитаминоз D у детей. Алма-Ата, 1976.— 36. Креам В. Е. et al.— «Arch. Biochem.», 1977, v. 179, p. 462—468.— 37. Stern P. H., Trummel C. L., Schnoes H. K. et al.— «Endocrinology», 1975, v. 97, p. 1552—1558.

Поступила 26/Х 1977 г.

COMPARISON OF BIOLOGICAL ACTIVITY AND TOXIC EFFECT OF 1α -HYDROXYCHOLECALCIFEROL AND ERGOCALCIFEROL IN RATS

V. B. Spirichev, N. V. Blazhevich, N. A. Bogoslovsky, G. I. Samokhvalov,
V. M. Avvakumov, V. A. Isaeva, A. L. Pozdnyakov, S. K. Sokolova, S. V. Sokolova,
O. G. Pereverzeva, L. D. Ryazantseva, Fernandes R. Reglado

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, All-Union
Research Institute of Vitamins, Ministry of Medical Industry of the USSR, Moscow

Single administration of 0.25 μg of synthetic 1α -hydroxycholecalciferol ($1\alpha\text{OHD}_3$) into nephrectomized rats, maintained at D-avitaminous diet, improved the active transport of calcium ions against the concentration gradient in small intestine of these animals, whereas ergocalciferol was biologically inactive under the same conditions. Administration of $1\alpha\text{OHD}_3$ during 5 days at a dose 0.025 μg normalized calcium content in blood serum of rats with D-avitaminosis. Increased doses of $1\alpha\text{OHD}_3$, administered into intact animals, caused transient hyperphosphatemia, hypercalcemia, calcinosis of internal tissues (kidney heart, aorta) as well as death of some animals. $1\alpha\text{OHD}_3$ exceeded 400-fold the hypercalcemic and calcinose

effects of ergocalciferol. LD₅₀ for 1 α OHD₃ was equal to 100 μ g/kg, if it was administered during 5 days per os. Tissue calcinosis was developed after administration of a daily dose 10 μ g/kg, moderate hypercalcemia was caused by a daily dose 1 μ g/kg or 0.25 μ g per an animal; this amount is only 10-fold higher as compared with the physiologic requirement. Ergocalciferol caused hypercalcemia and metastatic calcification only at a dose 4000 μ g/kg. Clinical use of 1 α OHD₃ at doses, exceeding the physiologic requirements, has to be prohibited due to high activity of the preparation and to toxicity of its increased doses.

УДК 615.212.7.015.42:612.172.015.32

Л. В. Розе Е. Л. Розенфельд,

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННЫХ АМИНОВ НА ФОСФОРОЛИЗ И γ -АМИЛОЛИЗ ГЛИКОГЕНА В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ ПРИ АНЕСТЕЗИИ

Лаборатория биохимии и патохимии углеводного обмена Института биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

У неанестезированных крыс адреналин, норадреналин, серотонин, триптамин и 3-окситирамин активируют фосфороллиз гликогена в сердце за счет повышения активности фосфорилазы А. Анестезия нембуталом и эфиром препятствует стимулирующему фосфороллиз действию биогенных аминов, за исключением серотонина. Адреналин, введенный анестезированным нембуталом животным, тормозит фосфороллиз гликогена. Снижение γ -амилолиза гликогена под действием норадреналина проявляется у анестезированных и неанестезированных животных. Тормозящий эффект адреналина на γ -амилолиз гликогена в сердечной мышце крысы проявляется только при анестезии.

Гликоген в сердечной мышце подвергается деградации двумя различными путями — фосфороллизом и гидролизом. Фосфороллиз гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата осуществляется в цитоплазме системой гликогенфосфорилазы, регуляция которой, как известно, осуществляется с помощью катехоламинов [1—3]. Другой путь деградации гликогена — γ -амилолиз до свободной глюкозы с участием кислой α -глюкозидазы, локализованной в лизосомах, — в тканях животных открыт сравнительно недавно, и процессы его регуляции изучены менее детально [4]. Известно, что в регулировании гидролитического пути распада гликогена в различных тканях также участвуют биогенные амины — адреналин и норадреналин [4, 5], причем действие одного и того же амина в различных тканях часто противоположно. По-видимому, регуляция фосфороллиза и гидролиза гликогена с помощью биогенных аминов осуществляется различными путями.

Избыточные дозы катехоламинов способствуют развитию гипоксических изменений миокарда, которые приводят к появлению признаков коронарной недостаточности, некрозов миокарда [6]. В основе этих явлений лежат нарушения аэробных процессов образования энергии, а стимуляция гликогенолиза и гликолиза рассматривается как один из компенсаторных механизмов, направленных на энергообеспечение миокарда в условиях гипоксии [6, 7]. Роль гидролитического распада гликогена в этих условиях еще не совсем ясна.

В настоящей работе приводятся данные по изучению особенностей регуляции биогенными аминами фосфороллиза и гидролиза гликогена в миокарде крыс и о влиянии на эти процессы анестезии.

Методика

Самцы крыс линии Вистар массой 160—200 г перед опытом не получали пищи в течение 17—18 ч, имея свободный доступ к воде. Растворы биогенных аминов на 0,85% NaCl инъектировали подкожно. Адреналин, норадреналин, тирамин, 3-окситирамин вводили в количестве 0,46 мкмоль на 200 г массы тела, серотонин, триптамин — 2,3 мкмоль на 200 г массы тела, контрольным животным — физиологический раствор в том же объеме. Спустя 30 мин животных декапитировали. Для определения фосфорилазной активности верхушку сердца быстро замораживали между двумя блоками сухого льда и хранили на

сухом льду до начала исследования. Активность фосфорилазы исследовали через 1 ч после декапитации животных. Ткань для определения кислой α -глюкозидазы хранили при -20°C в течение 1—2 сут. В опытах с применением нембутала животным вводили внутривенно раствор нембутала на 0,85% NaCl в количестве 14 мг на 200 г, через 10 мин вводили амины, спустя еще 30 мин крыс деканитировали. В эксперименте с анестезией эфиром животным вводили амины и через 30 мин крыс забивали под легким эфирным наркозом.

Активность фосфорилазы определяли по образованию неорганического фосфата в реакции биосинтеза гликогена [8]. Гомогенат не центрифугировали. Общую фосфорилазную активность определяли в присутствии 1,5 мМ 5'-АМФ, активность фосфорилазы А — в отсутствие 5'-АМФ. Активность выражали в микромолях P_i , освобожденного за 1 мин на 1 г свежей ткани.

Активность кислой α -глюкозидазы измеряли по количеству глюкозы, образовавшейся в результате реакции; использовали частично очищенный препарат кислой α -глюкозидазы, не содержащей α -амилазы. Ткань гомогенизировали на холоде с двумя объемами раствора Ауричио (25 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА pH 6,9) в стеклянном гомогенизаторе, гомогенат выдерживали при комнатной температуре 30 мин и центрифугировали при 7000 об/мин 20 мин. К надосадочной жидкости добавляли 0,5 М CH_3COOH до pH 4,8, прогревали 20 мин при 60°C и центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин. Полученный препарат не содержал примеси α -амилазы, что было проверено по реакции расщепления крахмала. Глюкоамилазную активность кислой α -глюкозидазы определяли по скорости гидролиза гликогена, мальтазную активность — по скорости расщепления мальтозы. Инкубационная проба содержала 0,1 мл частично очищенного препарата кислой α -глюкозидазы и 0,1 мл раствора гликогена 30 мг/мл на 0,1 н. ацетатном буфере с 0,001 М ЭДТА pH 4,8 или 0,1 мл раствора мальтозы 2,5 мг/мл на том же буфере. Пробы инкубировали при 37°C , реакцию останавливали добавлением 0,4 мл 0,3 н. NaOH и 0,4 мл 5% ZnSO_4 . В надосадочной жидкости определяли содержание глюкозы глюкозооксидазным методом [9]. Активность выражали в микромолях освобожденной глюкозы в минуту на 1 мг белка. Белок определяли методом Лоури [10]. Данные о величинах активности обработаны методом оценки расхождения двух средних путем сопоставления парных наблюдений согласно В. Л. Вознесенскому [11].

Результаты и обсуждение

У неанестезированных контрольных животных активность фосфорилазы А составляла около 30% от активности общей фосфорилазы. Введение неанестезированным животным адреналина, порадrenalина, серотонина, триптамина, тирамина и 3-окситирамина вызывало повышение в сердце крыс активности фосфорилазы А, причем наименьшее увеличение вызывал порадrenalин, наибольшее — адреналин и серотонин (табл. 1). Общая активность фосфорилазы статистически достоверно повышалась при введении адреналина, серотонина и 3-окситирамина. Норадреналин вызывал понижение общей активности, что согласуется с данными других авторов [12].

Таблица 1

Влияние анестезии и биогенных аминов на активность фосфорилазы в сердце крысы (в микромолях P_i за минуту на 1 г ткани)

Условия опыта	Контроль		Адреналин		Норадреналин		Серотонин		Триптамин		Тирамин		3-Окситирамин	
	A+B	A	A+B	A	A+B	A	A+B	A	A+B	A	A+B	A	A+B	A
Без анестезии	65,3	19,3	72,3±0,6*	36,3±4,9*	62,6±0,7*	20,9±0,5*	72,8±1,6*	36,5±0,4*	71,5±5,2	28,8±2,1*	77,3±5,1*	35,9±0,9*	92,2±4,4*	26,7±2,0*
Анестезия нембуталом	82,8	50,0	74,6±1,8*	37,8±2,0*	83,0±1,4	47,2±0,8	93,7±1,0*	80,8±2,1*	86,4±4,3	61,0±2,6	83,3±1,4	55,0±2,8	75,3±3,1	51,0±4,5
Анестезия эфиром	47,5	23,1	46,0±2,5	21,2±1,7	40,3±4,3	18,8±3,8	51,6±2,5	36,5±3,7	46,2±5,5	22,1±3,3	45,9±5,8	21,0±3,3	41,1±4,5	25,8±2,9

Примечание. * Здесь и в табл. 2: $P < 0,05$ по сравнению с контролем. А + Б — общая активность фосфорилазы; А — активность фосфорилазы А. Каждая цифра — средний результат от 8—16 животных.

Введение нембутала контрольным животным приводило к повышению общей активности фосфорилазы и фосфорилазы А. Одновременно менялось отношение активности фосфорилазы А к общей активности, составлявшее 66 % вместо 30 %. Введение анестезированным нембуталом животным норадреналина, триптамина, тирамина и 3-окситирамина не вызывало никаких изменений ни в активности фосфорилазы А, ни в общей фосфорилазной активности (см. табл. 1). Адреналин оказывал даже некоторое тормозящее действие на фосфорилазу А и общую фосфорилазу, и лишь серотонин сохранял свое стимулирующее влияние на фосфоролиз, вызывая повышение активности фосфорилазы А и общей фосфорилазной активности. После введения серотонина анестезированным нембуталом животным фосфорилаза в активной форме составляла около 83 % от общей активности. Таким образом, анестезия крыс нембуталом препятствовала активирующему действию аминов на фосфоролиз.

Т а б л и ц а 2

Влияние биогенных аминов и анестезии на глюкоамилазную и мальтазную активность кислой α -глюкозидазы в сердце крыс (в мкмольях глюкозы за минуту на 1 мг белка $\times 10^3$)

Исследуемая активность	Условия опыта	Контроль	Адреналин	Норадреналин	Серотонин	Триптамин	Тирамин	3-Окситирамин
Глюкоамилазная	Без анестезии	2,5	2,7 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2*	2,7 \pm 0,2	2,4 \pm 0,1	2,7 \pm 0,4	2,3 \pm 0,2
	Анестезия нембуталом	2,5	1,6 \pm 0,2*	1,3 \pm 0,2*	1,8 \pm 0,2*	2,7 \pm 0,2	2,2 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2
	Анестезия эфиром	1,8 3,3	1,8 \pm 0,1 —	1,0 \pm 0,1* —	1,6 \pm 0,3 —	— 2,8 \pm 0,1*	— 3,0 \pm 0,1*	— 2,8 \pm 0,1*
Мальтазная	Без анестезии	4,2	4,5 \pm 0,3	3,2 \pm 0,2*	3,9 \pm 0,3	3,9 \pm 0,3	3,7 \pm 0,2	4,0 \pm 0,3
	Анестезия нембуталом	5,1	3,1 \pm 0,4*	3,1* \pm 0,5	5,4 \pm 0,5	4,9 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2	4,6 \pm 0,1
	Анестезия эфиром	3,8	2,2 \pm 0,3*	2,2 \pm 0,4*	3,1 \pm 0,5	3,2 \pm 0,2*	3,2 \pm 0,1*	2,8 \pm 0,1*

Пр и м е ч а н и е. Каждая цифра — средний результат от 8—14 животных.

В опытах с анестезией эфиром активирующее действие аминов, за исключением серотонина, также не проявлялось (см. табл. 1). Как и в случае с нембуталом, эфир повышал отношение активности фосфорилазы А к активности общей фосфорилазы, и активирующего действия биогенных аминов при этом не обнаруживали.

Хотя в целом ряде работ в различных условиях опыта было показано стимулирующее влияние адреналина и норадреналина на активность фосфорилазы А в сердечной мышце [12—15], однако в литературе имеется сообщение о понижении фосфорилазной активности в сердце крыс в ответ на введение адреналина [16]. По-видимому, одним из объяснений этого факта может являться то, что в данном случае был применен в качестве наркоза нембутал. У крыс, анестезированных гексобарбиталом, не наблюдали каких-либо изменений активности фосфорилазы А сердечной мышцы при введении адреналина и норадреналина [17]. Применение различных анестезирующих веществ, в частности производных барбитуровой кислоты, в подобных опытах преследует цель исключить влияние различных видов стресса, сопровождающихся выделением в кровь биологически активных веществ,

в том числе катехоламинов. Показано, что определить истинные величины активности фосфорилазы А в печени можно только у анестезированных крыс и мышей, так как декапитация животных и методика замораживания ткани существенным образом сказываются на активности фосфорилазы [18].

В данной работе применение анестезирующих веществ (нембутала и эфира) способствовало повышению активности фосфорилазы А в сердце крыс и значительно изменило результаты действия биогенных аминов. Возможно, одной из причин, объясняющей противоречивые результаты, касающиеся действия адреналина на фосфоролит миокарда, может являться применение различными авторами различных анестезирующих веществ.

Нами было исследовано также влияние биогенных аминов на мальтазную и глюкоамилазную активности кислот α -глюкозидазы в сердце неанестезированных и анестезированных животных. Оказалось, что у неанестезированных животных норадrenalин, активирующий фосфоролит, снижал глюкоамилазную активность кислот α -глюкозидазы. Остальные исследованные амины не оказывали на γ -амилолиз гликогена никакого действия (табл. 2). На фоне анестезии нембуталом наблюдается снижение гидролиза гликогена при введении адреналина и серотонина (см. табл. 2). Эфир вызывает торможение гидролиза гликогена при введении не только норадrenalина, но и триптамина, тирамина и 3-окситирамина (см. табл. 2).

Изменение мальтазной активности кислот α -глюкозидазы при введении аминов неанестезированным животным представлено в табл. 2. Анестезия эфиром способствует снижению мальтазной активности адреналином и 3-окситирамином; нембутал действует иначе, но тормозящее действие норадrenalина сохраняется в любом случае (см. табл. 2).

На каком этапе регулирования фосфоролита и гидролиза гликогена включается действие исследованных анестезирующих веществ, сказать трудно. При γ -амилолизе гликогена влияние нембутала и эфира совпадает с направлением действия норадrenalина и его тормозящее влияние на фоне анестезии не только сохраняется, но даже усиливается. При повышении исходной активности фосфорилазы А и общей фосфорилазы при анестезии только серотонин способен еще стимулировать переход фосфорилазы из неактивной в активную форму. Введение адреналина на фоне нембутала вызывает не активацию, а торможение фосфоролита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Williamson J. R.— In: Handbook of Physiol. Washington, 1975, sect. 7, v. 6, p. 605.— 2. Fischer E. H., Heilmeyer Jr. L. M. G., Haschke R. H.— Curr. Top. Cell. Regulat., 1971, v. 4, p. 211.— 3. Larner J.— Circulat. Res., 1976, v. 38, N 5, Suppl. 1, p. 2—6.— 4. Rosenfeld E. L.— Path. Biol., 1975, v. 23, p. 71.— 5. Rosenfeld E. L., Порова I. A., Орлова V. S.— Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 1970, v. 52, p. 1111.— 6. Долгов В. В., Райскина М. Е., Антонов В. Ф.— В кн.: Биофизические основы патологического состояния мышц и энергетическое обеспечение сократительного аппарата. Тбилиси, 1973, с. 60.— 7. V ik h e r t A. M., Ш е р а с х е н с о N. M.— Circulat. Res., 1974, v. 35, N 3, Suppl. 3, p. 182.— 8. Hess H.— G.— Advanc. metab. Dis., 1964, v. 1, p. 1.— 9. Лукомская И. С., Городецкий В. К.— Биохимия, 1961, т. 26, с. 477.— 10. Lowry O. H., Rosenbrough W. J., Farr A. L. et al.— J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.— 11. Вознесенский В. Л. Первичная обработка [биологических] и экспериментальных данных. Л., 1969.— 12. Duparowicz I.— Acta physiol. pol., 1974, v. 25, p. 135.— 13. Розенфельд Е. Л., Попова И. А., Орлова В. С.— Биохимия, 1970, т. 35, с. 356.— 14. Hess M. E., Haugaard N.— J. Pharmacol. exp. Ther., 1958, v. 122, p. 169.— 15. Nutall F. Q., Gannon M. C., Bergstrom W. J.— Am. J. Physiol., 1975, v. 228, p. 1815.— 16. Вережачкова Э. П.— Кардиология, 1976, № 4, с. 117.— 17. Hognbook K. R., Brody T. M.— J. Pharmacol. exp. Ther., 1963, v. 140, p. 295.— 18. Stalmans W., Wulf H., Hue L. et al.— Europ. J. Biochem., 1974, v. 41, p. 127.

Поступила 25/Х 1977 г.

EFFECT OF BIOGENIC AMINES ON PHOSPHOROLYSIS AND γ -AMYLOLYSIS OF GLYCOGEN IN RAT HEART MUSCLE UNDER ANESTHESIA

L. V. Rose, E. L. Rosenfeld

Laboratory of Biochemistry and Pathochemistry of Carbohydrate Metabolism,
Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the
USSR, Moscow

Adrenaline, noradrenaline, serotonin, triptamine and 3-hydroxytyramine activated glycogen phosphorolysis in heart of nonanesthetized rats due to increase in the phosphorylase A activity. Anesthesia with nembutal and ether prevented the stimulating effect of biogenic amines (excluding serotonin) on phosphorolysis. Adrenaline, administered into animals anesthetized with nembutal, inhibited the glycogen phosphorolysis. Noradrenaline caused a decrease in γ -amylolysis of glycogen in anesthetized and untreated rats. The inhibitory effect of adrenaline on glycogen γ -amylolysis occurred in rat heart muscle only under the conditions of anesthesia.

УДК 576.851.48.098.31.083

С. С. Александрова, И. И. Никольская, С. С. Дебов

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА ФЕРМЕНТОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ИЗ КЛЕТОК *ESHERICHIA COLI* СК НА ФОСФОЦЕЛЛЮЛОЗЕ P-11

Лаборатория энзимологии АМН СССР, Москва

Исследовали условия фракционирования и очистки метилаз из клеток *E. coli* СК на фосфоцеллюлозе P-11. Исходным препаратом для проведения колоночной хроматографии служила фракция, полученная после осаждения сульфатом аммония. Элюирование проводили линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 0,8 М. При этом метилазная активность обнаруживалась в оттекающей жидкости (Н), промывных водах (П) и в зоне градиента (Г). Ферменты фракций, не адсорбирующихся на фосфоцеллюлозе P-11, содержали метилазы аденина и цитозина. При градиентном элюировании метилазная активность была найдена в 5 дискретных зонах, которым соответствовали концентрации NaCl — 0,12, 0,18, 0,26, 0,33 и 0,68 М. Удельная активность разных фракций в процессе очистки возрастала в 10—40 раз. Показано, что ферменты фракций 1, 2 и 5 содержали только метилазу аденина и не обладали цитозинметилирующей активностью. Фракции 3 и 4 содержали смесь ферментов, метилирующих аденин и цитозин. Полученные результаты свидетельствуют о наличии в клетках *E. coli* СК нескольких метилаз, а также о возможности существования этих ферментов в изоферментных формах.

Ранее нами было показано [1], что ферменты метилирования и модификации ДНК из клеток *E. coli* СК при фракционировании на ДЭАЭ-целлюлозе элюируются одним пиком, тогда как при катионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе обнаруживается гетерогенность метилаз. Задача представленной работы состояла в том, чтобы детально изучить поведение метилаз и ферментов модификации ДНК из клеток *E. coli* СК, а также оценить возможность более эффективной их очистки на катионообменнике фосфоцеллюлозе P-11, широко используемом в настоящее время для разделения и очистки ферментов рестрикции и модификации ДНК [2, 3].

Методы

Донором метильных групп служил ^3H -S-аденозил-L-метионин [^3H -SAM] фирмы «Amersham» с удельной радиоактивностью 7,9 Ки/ммоль. ДНК тимуса — коммерческий препарат фирмы «Calbiochem». Фосфоцеллюлоза P-11 (ФЦ P-11) — коммерческий препарат фирмы «Whatman».

Выращивание бактерий. Культуру *E. coli* СК выращивали на синтетической среде M9 [4] до стационарной фазы роста. Микробную массу хранили при -20°C в течение 4—8 нед.

Для получения бактериального экстракта замороженную биомассу оттаивали в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 7,0, содержащем 50 мкм ЭДТА и 2,4 мМ меркаптоэтанол (буфер PEM), и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE. Грубый экстракт

подвергали обработке стрептомицина-сульфатом и сульфатом аммония, как описано ранее [1]. Для последующих процедур использовали фракцию, полученную после осаждения сульфатом аммония 0,6 насыщения (фракция СА).

Подготовка ионообменника. После первичной обработки с помощью HCl и NaOH ФЦ Р-11 переводили в натриевую форму промыванием 4 М NaCl, отмывали буфером РЭМ и хранили в этом же буфере.

Хроматография на ФЦ Р-11. Фракцию СА, содержащую 150—200 мг белка, после исчерпывающего диализа наносили на колонку с ФЦ Р-11 размером 1×15 см. Концентрация белка составляла 2 мг/мл. Колонку промывали буфером РЕМ и элюировали лилейным градиентом NaCl рН 7,0 (0—0,8 М). Скорость элюирования 27 мл/ч, объем фракций — 4 мл. В ряде экспериментов на всех этапах фракционирования присутствовал тритон X-100 в концентрации 0,2%. Для определения метилазной активности инкубационная смесь содержала 100 мг акцепторной ДНК, 2 мкКи ³H-SAM и 0,5 мл фракции, обладающей ферментативной активностью. Затем пробы обрабатывали, как описано ранее [5]. За единицу активности метилаз принимали количество импульсов в минуту в расчете на 100 мг акцепторной ДНК и 1 мг белка за 1 мин инкубации при стандартных условиях. Для идентификации метилированного продукта кислотопераставляемую фракцию подвергали гидролизу HClO₄. Продукты гидролиза определяли методом нисходящей бумажной хроматографии по описанной ранее методике [6].

Результаты и обсуждение

Фракционирование на ФЦ Р - 11 в настоящее время широко применяется для очистки ферментов, ответственных за специфичность ДНК в отношении хозяина (как модифицирующих метилаз, так и рестриктирующих эндонуклеаз). Поскольку представленная работа является частью исследований по изучению системы специфичности клеток хозяина *E. coli* СК, мы исследовали поведение ферментов метилирования и модификации на катионите ФЦ Р - 11.

Исходным препаратом служила фракция СА. Материал наносили на колонку при рН 7,0, промывали буфером РЕМ и элюировали линейно возрастающей концентрацией NaCl.

Поскольку агрегация белка во время колоночной хроматографии может существенно влиять на результаты фракционирования, хроматография метилаз на ФЦ Р - 11 осуществлялась нами как в присутствии тритона X - 100, предотвращающего такую агрегацию, так и без него.

Результаты эксперимента, проведенного в отсутствие тритона X-100, представлены на рис. 1, а. Как видно из рис. 1, активность фермента обнаруживалась в оттекающей жидкости (Н), промывных водах (П) и в зоне градиента (Г).

Во фракции П, характеризующейся слабой связью фермента с обменником, присутствовало 3 пика ферментативной активности. В зоне градиента, как показано на рис. 1, а, метилазная активность элюировалась в виде 5 пиков с сильно выраженной гетерогенностью при следующих концентрациях NaCl: 0,12, 0,18, 0,26, 0,33 и 0,68 М. Кроме того, при элюировании 1 М NaCl регулярно появлялся еще 1 пик ферментативной активности.

На рис. 1, б приведены результаты колоночной хроматографии метилаз в присутствии тритона X-100. Из сопоставления рис. 1, а и 1, б видно, что метилазные профили в общем совпадают, однако тритон X-100 позволяет устранить множественность пиков в промывных водах и гетерогенность их в зоне градиента, а также приводит к исчезновению пика в зоне 1 М NaCl. В то же время, как показано на рис. 1, а и б, распределение белка во фракциях в обоих случаях остается практически неизменным.

На основании величины радиоактивности акцепторной ДНК можно также считать, что десорбция метилаз в присутствии тритона X-100 возрастает приблизительно на 35 %, что является весьма важным обстоятельством для получения достаточных количеств активных ферментов.

Эксперименты показали, что для метилаз *E. coli* СК тритон X-100 является необходимым фактором, обеспечивающим получение гомогенных пиков и воспроизводимых результатов. Поэтому в последующих экспериментах на всех стадиях фракционирования обязательным было введение тритона X-100 до конечной концентрации 0,2 %.

В табл. 1 приведены данные по степени очистки каждой метилирующей фракции. Для фракции Н и П, не связавшихся с обменником, повышения удельной активности практически не происходило ввиду большого количества балластных белков в препарате. Для фракций, элюирующихся в градиенте, наблюдалось повышение удельной активности в 15—40 раз. Процент открытия метилирующей активности не превышал 60. В целом результаты очистки, полученные на этом катионите, сопоставимы с результатами, опубликованными ранее для фракционирования этого же материала на КМ-цел-

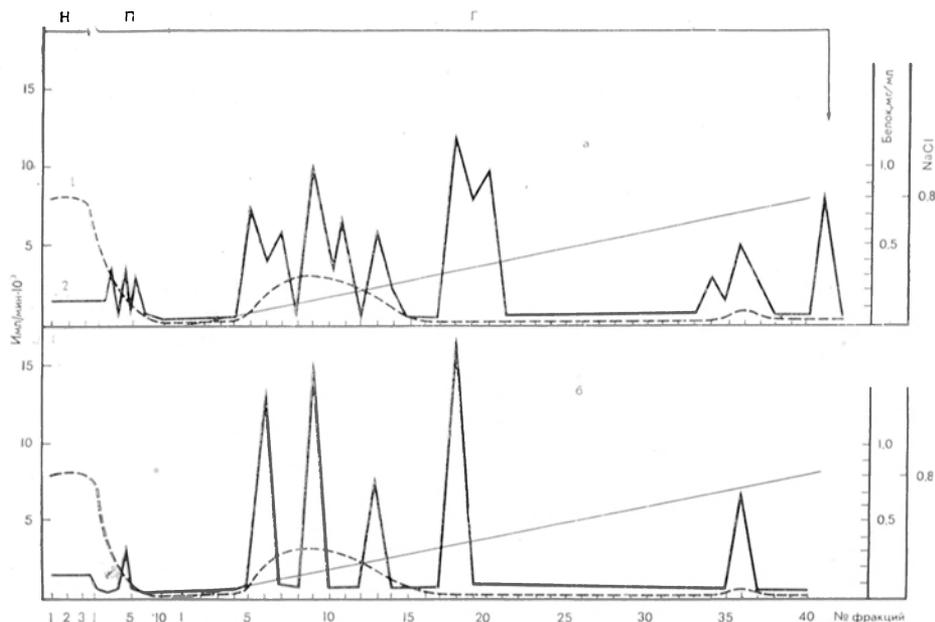


Рис. 1. Хроматография на ФЦ Р-11 фракции после осаждения сульфатом аммония в отсутствие (а) и при наличии (б) тритона X-100.

По оси ординат слева — радиоактивность; справа — содержание белка.

1 — содержание белка; 2 — метилирующая активность; Н — нанесение материала на колонку; П — промывка колонки; Г — градиентное элюирование. Размер колонки 1 × 15 см с катионитом в Na-форме. Материал (Н) в объеме 150 мл наносили со скоростью 25 мл/ч. Промывали 150 мл буфера РЕМ рН 7,0. Элюировали градиентом NaCl 0—0,8 М. Скорость элюирования 25 мл/ч. Объем фракции — 4 мл, вертикальная стрелка — начало ступенчатого элюирования 1 М NaCl.

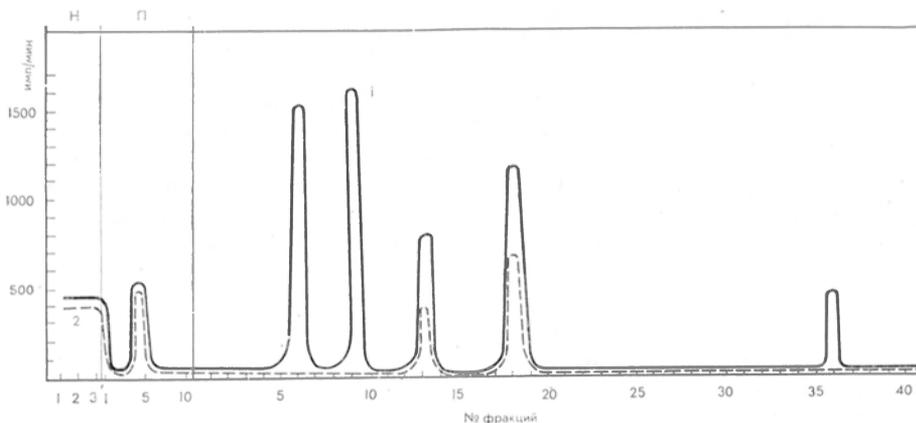


Рис. 2. Разделение ферментов метилирования по специфичности к метилируемому основанию в процессе хроматографии на ФЦ Р-11.

По оси ординат — радиоактивность. 1 — метилаза аденина; 2 — метилаза цитозина. Н, П и Г — см. рис. 1. 100 мкг тимусной ДНК метилировали в присутствии ^3H -SAM с помощью 0,5 мл ферментативной фракции в течение 2 ч. На один лист хроматографической бумаги наносили хлорниксильный гидролизат 500 мкг ДНК.

люлозе в отношении как степени открытия, так и повышения удельной активности.

Определение специфичности метилаз в отношении метилируемого основания. В процессе ионообменной хроматографии на ФЦ Р - 11 обнаружены 7 зон метилирующей активности, включая фракции Н и П, не связывающиеся с обменником. Такой результат указывает, с одной стороны, на возможность присутствия нескольких видов метилаз, отличающихся по специфичности, а с другой — на возможность наличия изоферментных форм.

Одним из видов специфичности метилаз является специфичность к метилируемому основанию.

Идентификацию метилируемого основания проводили посредством определения локализации радиоактивности при хроматографии хлорнокислого гидролизата акцепторной ДНК. Для этой цели 500 мкг ДНК метилировали в присутствии $^3\text{H-SAM}$ соответствующими фракциями, обладающими ферментативной активностью. Далее материал обрабатывали, как описано в «Методах».

Результаты определений представлены на рис. 2. Как видим, во фракциях, не адсорбирующихся и слабо адсорбирующихся на ФЦ Р - 11 (Н и П), были идентифицированы метилазы, специфические как для аденина, так и для цитозина. В градиенте с высокой степенью воспроизводимости нами было найдено 5 пиков метилирующей активности. Как следует из рис. 2, ферменты фракций Г₁, Г₂ и Г₅ представлены метилазой аденина без следов цитозинметилирующей активности. Фракции Г₃ и Г₄ содержали смесь метилаз аденина и цитозина.

Таким образом, в процессе хроматографии было получено 7 хорошо воспроизводившихся зон, содержащих аденинметилирующую активность, и 4 зоны, содержащие метилазы цитозина. Наличие каждой из них может быть обусловлено либо присутствием ферментов, отличающихся по специфичности к метилируемой последовательности, либо эти ферменты представлены разными изоформами, узнающими один и тот же сайт. Не исключено также сочетание обеих этих возможностей, и для окончательного вывода на этот счет необходимы эксперименты по перекрестному метилированию.

Стабильность и хранение метилаз. Активность метилирующих ферментов оказалась весьма нестабильной при хранении. Как видно из данных табл. 2, наиболее стабильна фракция Н, не связавшаяся с обменником. За 5 сут хранения активность этих ферментов сохранялась на 30 %, тогда как фракции градиента Г₁, Г₂, Г₃ и Г₄ за это время инактивировались практически полностью. Наиболее лабильной оказалась фракция Г₅, которая полностью теряла активность в течение 1 сут.

Хранение в присутствии 50 % глицерина не приводило к стабилизации активности. В то же время фракции, диализованные против 50 % глицерина,

Т а б л и ц а 1
Характеристика стадий очистки метилаз из *E. coli* СК на фосфоцеллюлозе Р-11

Стадия очистки	Общий блок, мг	Общая активность, ед	Удельная активность, ед.	Активность от исходной, %
Грубый экстракт	415	13 100	31,5	100
Фракция СА	175	10 500	60,0	80
ФЦ-Р11*				
Н	119	3 750	31,5	—
П	14,6	500	34,3	—
Г ₁	0,88	867	985	—
Г ₂	1,2	1,007	833	—
Г ₃	0,68	254	372,5	—
Г ₄	0,52	667	1282	—
Г ₅	0,48	220	460	—
Всего		7 265		56

* При фракционировании на ФЦ Р-11 пик Н метилазной активности не адсорбируется на обменнике, пик П сходит при промывании буфером, Г₁ — Г₅ элюируются в градиенте.

оказались заметно более стабильными, особенно фракция Н, которая сохраняла 100 % активность в течение 7 сут.

Стабилизация при диализе против глицерина уже отмечалась нами ранее [1] для метилаз, полученных при фракционировании этого материала на колонках с КМ-целлюлозой (см. табл. 2).

Давая сравнительную оценку результатов фракционирования метилаз ДНК из клеток *E. coli* СК на колонках с КМ-целлюлозой, которые получены ранее, и ФЦ Р - 11, которые представлены в настоящей работе, следует отметить ряд моментов.

Очистка от балластных белков, суммарный выход ферментов, равно как и повышение удельной активности разных фракций, для обоих обменников в целом одинаковы.

Т а б л и ц а 2

Влияние различных способов хранения на активность метилирующих ферментов

Катионит	Фракция метилазы	Активность от исходной при хранении, %						
		-10°C		в 50% глицерине, -20°C		после диализа против 50% глицерина, -20°C		
		3 сут	5 сут	3 сут	5 сут	3 сут	5 сут	7 сут
ФЦ-Р 11	Н*	100	27±5	100	27±5	100	100	100
	Г ₁ **	100	<5	100	<5	100	30±5	10±2
	Г ₂	100	<5	100	<5	100	30±5	10±2
	Г ₃	100	<5	100	<5	100	30±5	10±2
	Г ₄	100	<5	100	<5	100	30±5	10±2
	Г ₅	0,0		0,0				
КМЦ***	Н	100		100		500		350
	Г _{II}					100	100	100

* Фракция, не связавшаяся с обменником.

** Г₁ — Г₅ — фракции, элюирующиеся в градиенте.

*** Для сравнения приведены соответствующие метилирующие фракции, полученные при фракционировании на КМ-целлюлозе.

Различия удается обнаружить при изучении метилирующего профиля и специфичности разных фракций к метилируемому основанию.

Достоинства очистки и фракционирования на КМ-целлюлозе состоят в том, что за один цикл хроматографии удается обнаружить 2 дискретные зоны, содержащие метилазу цитозина и свободные от аденинметилирующей активности, и 4 зоны, содержащие метилазу аденина, 3 из которых не содержат цитозиновых метилаз. При использовании фосфоцеллюлозы не удается добиться такого количества фракций, свободных от интерферирующей активности. Преимуществом этого катионита следует считать большее количество метилирующих в отношении аденина [7] и цитозина [4] пиков, отражающих, по-видимому, как присутствие изоферментов, так и существование метилаз с разными сайтами узнавания. Поскольку 3 зоны содержат метилазу аденина, свободную от цитозинметилирующей активности, мы считаем этот обменник более перспективным при дальнейшем изучении ферментов, метилирующих аденин.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Никольская И. И., Александрова С. С., Лопатина Н. Г. и др. — Биохимия, 1977, т. 42, с. 598. — 2. Lautenberger J. A., Linn S. — J. biol. Chem., 1972, v. 19, p. 6176. — 3. Eskin B., Linn S. — Ibid, 1972, v. 19, p. 6183. — 4. Тихоненко Т. И., Винецкий Ю. П., Земцова Э. В. — Микробиология, 1961, № 6, с. 1020. — 5. Николь-

ская И. И., Ванюшин Б. Ф., Мардашев С. Р. — Биохимия, 1975, т. 40, с. 1081. — G. Nikol'skaya I. I., Lopatina N. G., Charlygina N. M. et al. — J. molec. cell. Biochem., 1976, v. 13, p. 79.

Поступила 9/XII 1977 г.

FRACTIONATION AND PURIFICATION OF THE ENZYMES, METHYLATING DNA IN CELLS OF ESCHERICHIA COLI CK, USING PHOSPHOCELLULOSE P-11

S. S. Alexandrova, I. I. Nikol'skaya, S. S. Debov

Laboratory of Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Conditions for purification and fractionation of the methylases from E. coli CK cells using phosphocellulose P-11 were studied. A fraction, obtained after ammonium sulphate precipitation, was used as a starting preparation for column chromatography. Elution was carried out with linear gradient of NaCl concentration from 0 to 0.8 M. The methylase activity was found in effluent fractions, in rinsing solutions and in the gradient zone (G). The fractions, unadsorbed on P-11, contained methylases of adenine and cytosine. In the experiments with the gradient elution the methylase activity was observed in fractions, corresponding to NaCl concentration of 0.12, 0.18, 0.26, 0.33 and 0.68 M. The specific activity was increased 10-40-fold in the fractions during the purification. The G₁, G₂ and G₅ fractions contained only the adenine methylase and did not possess the cytosine-methylating activity. A mixture of enzymes, methylating adenine and cytosine, was found in G₃ and G₄ fractions. The data obtained suggest that several methylases are present in E. coli CK cells; these enzymes exist apparently as isoenzymes.

УДК 615.281.8.015.42:576.858.75.098.396.332

Г. Л. Линицкая, А. А. Яцына, Н. Л. Пушкарская, Г. А. Галегов

ВЛИЯНИЕ РИБОВИРИНА (1-β-D-РИБОФУРАНОЗИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-КАРБОКСИМИДА) НА ИНДУКЦИЮ РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И ОБРАЗОВАНИЕ ВИРУСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСОМ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ГРИППА А

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

Противогриппозный препарат рибовирин ингибирует индуцированный вирусом синтез РНК-зависимой РНК-полимеразы в культуре клеток, инфицированных вирусом гриппа А, и тормозит образование вирусных полисом. Полученные результаты указывают на способность рибовирина подавлять синтез вирусспецифических белков.

В последние годы большое внимание было уделено противогриппозному препарату рибовирину, который обладает способностью подавлять репродукцию ряда ДНК- и РНК-содержащих вирусов, в том числе вирусов гриппа А и В [1—3]. Было показано, что под влиянием этого ингибитора подавляется тотальный синтез полипептидов вируса гриппа [4]. В плане дальнейшего изучения механизма действия рибовирина на синтез вирусспецифических белков мы исследовали его влияние на индукцию РНК-зависимой РНК-полимеразы, катализирующей синтез РНК вируса гриппа, и на образование вирусспецифических полисом.

Методика

В работе использовали 48-часовую культуру куриных фибробластов, инфицированную вирусом гриппа А (вирус классической чумы птиц, штамм Вейбридж). Эта модель, как было впервые показано нами, с успехом используется для выявления антигриппозного действия синтетических препаратов [5—7]. В качестве поддерживающей среды применяли питательную среду № 199. Множественность заражения 5—10 БОЕ

(бляшкообразующих единиц) на клетку. Активность РНК-полимеразы определяли общепринятым методом [8]. В качестве источника фермента использовали микросомальную фракцию, полученную после центрифугирования свободного от ядер и митохондрий супернатанта в течение 1 ч при 105 000g. Полисомы выделяли по методу Понса [9] центрифугированием постмитохондриального супернатанта клеток в линейном градиенте концентраций сахарозы (15—40%). Специфичность полисомного материала идентифицировали обработкой постмитохондриального супернатанта ЭДТА и панкреатической РНК-азой, что приводило к полному распаду полисом. Методом гибридизации [9] меченой РНК, выделенной из полисом, с немеченой вирионной РНК было показано, что полисомы содержат РНК, комплементарную вирионной. Во всех экспериментах рибовирин вводили в поддерживающую среду непосредственно после адсорбции вируса.

Т а б л и ц а 1

Зависимость активности РНК-полимеразы, индуцированной вирусом гриппа А, от состава реакционной смеси на 5-м часу инфекции

Состав проб	Активность, имп/мин на 1 мг белка	
	неинфицированные клетки	инфицированные клетки
Полная система	3728±120	22 250±500
»	—	4 690±125*
При отсутствии ионов Mg ⁺⁺	3357±120	3 628±120
При отсутствии ГТФ	4511±150	3 780±120
При отсутствии актиномицина D	4135±150	22 137±500

П р и м е ч а н и е. Полная система: трис-НСI pH 8,0—100 мкмоль, MgCl₂ — 2 мкмоль, 2-меркаптоэтанол — 10 мкмоль, актиномицин D — 1 мкг, АТФ, ГТФ, ЦТФ — по 0,15 мкмоль, ³H-УТФ — 2 мкКи, белок — 200—300 мкг. Конечный объем — 0,4 мл. Инкубация — 30 мин при 33°C.

* Активность фермента определяли непосредственно после адсорбции вируса (0 ч инфекции).

Рибовирин был получен из отдела Lederle, American Cyanamide Company, U. S. A., актиномицин D и циклогексимид предоставила фирма «Calbiochem», АТФ, ГТФ, ЦТФ — фирма «Serva», ³H-УТФ — фирма «Amersham» (удельная активность 48 Ки/ммоль), ³H-уридин — отечественного производства, удельная радиоактивность 16—22 Ки/ммоль.

Результаты и обсуждение

Как следует из табл. 1, к 5-му часу инфекции наблюдается увеличение РНК-полимеразной активности в 5—6 раз по сравнению с неинфицированными клетками. Специфичность полимеразной реакции подтверждается обя-

зательным присутствием полного набора нуклеозидтрифосфатов и ионов Mg⁺⁺. На РНК-зависимый характер полимеразной реакции указывает отсутствие ее ингибирования высокими концентрациями актиномицина D. Для доказательства вирусспецифического характера РНК-полимеразы и ее синтеза de novo был использован ингибитор

Т а б л и ц а 2
Влияние рибовирина на индукцию РНК-зависимой РНК-полимеразы в культуре клеток, инфицированных вирусом гриппа А

Ингибитор, мкг/мл	Активность, имп/мин на 1 мг белка	
	3 ч инфекции	5 ч инфекции
0	19 275±450	23 330±500
50	8 500±180	12 500±250
100	5 426±150	3 625±120

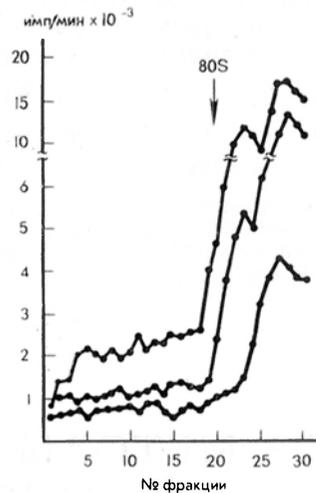
синтеза белка циклогексимид, который, будучи введен в состав поддерживающей среды в концентрации 5 мкг/мл непосредственно после адсорбции вируса, подавлял индукцию фермента более чем на 95%. Результаты, по-

лученные при изучении влияния рибовирина на индуцированный вирусом синтез РНК-полимеразы (табл. 2), показывают, что ингибитор в обеих используемых концентрациях почти полностью подавляет образование фермента как к 3-му, так и к 5-му часу инфекции. Учитывая, что обнаруженный эффект отражает подавление синтеза вирусспецифического белка РНК-полимеразы, и принимая во внимание данные Оксфорда [4] о способности этого ингибитора подавлять синтез практически всех белков вируса гриппа, мы сочли целесообразным изучить влияние этого препарата на образование полисом в культуре клеток, инфицированных вирусом гриппа А. На представленном рисунке кривой 1 показан типичный профиль распределения радиоактивности, соответствующий распределению полисомного материала в градиенте плотности сахарозы в неинфицированных клетках. Кривая 2 отражает те же показатели в клетках, инфицированных вирусом гриппа. Под влиянием вирусной инфекции наблюдается увеличение полисомного материала через $3\frac{1}{2}$ ч инфекции. Под действием рибовирина (кривая 3) обнаруживается снижение количества полисом на 50—55% по сравнению с инфицированными клетками, не обработанными препаратом.

Полученные результаты, а также литературные данные позволяют удовлетворительно воссоздать механизм ингибиторного действия рибовирина на репродукцию вируса гриппа. Обнаруженные ранее Шолтиссеком [10] и Оксфордом [4] способность рибовирина ингибировать синтеза вирусспецифических РНК и белков может быть объяснена данными, полученными нами: подавлением индукции РНК-полимеразы и подавлением образования полисомного материала в клетках, инфицированных вирусом гриппа. Обнаруженное торможение образования полисом может быть объяснено ингибированием синтеза комплементарных (информационных) РНК, ранее выявленное Шолтиссеком. По нашему мнению, все вышперечисленные эффекты, связанные с применением рибовирина, могут быть объяснены его способностью подавлять биосинтез гуаниловой кислоты [2], следствием чего может явиться ингибирование синтеза информационных РНК, образования полисом, синтеза РНК-полимеразы и других вирусспецифических белков, а также синтеза вирусных РНК. Учитывая вышесказанное, можно высказать предположение о том, что действие рибовирина на течение гриппозной инфекции не носит специфического характера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sidwell R. W., Huffman J. M., Khare G. P. et al. — Science, 1972, v. 177, p. 705. — 2. Streeter D. G., Witkowski J. T., Khare G. P. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, p. 1174. — 3. Suganuma T., Ishida N. — Tohoku Y. exp. Med., 1973, v. 110, p. 405. — 4. Oxford J. S. — J. gen. Virol., 1975, v. 28, p. 409. — 5. Galegov G. A., Puschkarskaya N. L., Layrov S. V. — Lancet, 1967, v. 11, p. 1086. — 6. Kato N., Eggers H. J. — Virology, 1969, v. 37, p. 632. — 7. Индулен М. К., Калыня В. А. — Acta virol., 1973, v. 17, p. 273. — 8. Mahy B. W., Bromley P. A. — J. Virol., 1970, v. 6, p. 259. — 9. Pons M. W. — Virology, 1972, v. 47, p. 823. — 10. Scholtissek C. — Arch. Virol., 1976, v. 50, p. 349.



Влияние рибовирина на образование вирусспецифических полисом в культуре клеток, инфицированных вирусом гриппа А (в качестве предшественника использовали ^3H -уридин).

1 — неинфицированные клетки; 2 — инфицированные клетки; 3 — инфицированные клетки, обработанные рибовирином в концентрации 100 мкг/мл.

EFFECT OF RIBOVIRINE (1- β -D-RIBOFURANOSYL-1,2,4-TRIAZOL-3-CARBOXIMIDE)
ON INDUCTION OF RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE AND FORMATION
OF VIRUS SPECIFIC POLYSOMES IN CELL CULTURE, INFECTED
WITH INFLUENZA A VIRUS

G. L. Linitzkaya, A. A. Yatsina, N. L. Pushkarskaya, G. A. Galegov

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

An antiinfluenzal preparation ribovirine inhibited the virus induced synthesis of RNA-dependent RNA polymerase in tissue culture of cells, infected with influenza A virus, and prevented formation of viral polysomes. The data suggest that ribovirine possesses the capacity to depress the synthesis of virus specific proteins.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.15-097.5-074

Б. Б. Дзантиев, Е. М. Гаврилова, А. М. Егоров,
М. Б. Смирнова, И. В. Березин

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНА А В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Кафедра химической энзимологии Московского университета им. М. В. Ломоносова

Комплекс иммуноглобулина А (IgA) с пероксидазой получен методом окисления углеводного компонента фермента периодатом натрия. Охарактеризован состав, иммунохимические и ферментативные свойства комплекса. При хранении при 4°C в растворе антигенные и ферментативные свойства комплекса сохраняются в течение 5 мес. Выделенный комплекс использован для иммуноферментного определения IgA в сыворотке крови человека. В основе метода лежит реакция конкурентного связывания свободных и меченных пероксидазой молекул IgA с антителами, иммобилизованными на неорганическом пористом носителе силохроме. Метод дает возможность количественно определять IgA в пределах концентраций 10^2 — 10^5 нг/мл.

Одним из важных направлений развития иммунохимического анализа является создание новых методов определения концентрации антигенов и антител, обладающих высокой чувствительностью и позволяющих проводить массовые анализы в научных исследованиях и медицинской практике. Одним из наиболее перспективных в этом плане является иммуноферментный анализ [1], основанный на использовании антител, осуществляющих высокоспецифическое взаимодействие с антигеном, и ферментов, с помощью которых комплекс антиген — антитело тестируется с высокой чувствительностью. В ряде методов исследований, например в электронной микроскопии, иммуноферментный анализ уже нашел широкое применение [2], но его использование для количественного определения растворимых антигенов еще довольно ограничено. Учитывая простоту применения иммуноферментных методов анализа, обеспечивающих высокую чувствительность и специфичность определения веществ в многокомпонентных системах при использовании простых оптических приборов, разработка иммуноферментных методик определения большого числа веществ представляется акту-

альной. Иммуноферментный метод с успехом применен для детекции IDG [3, 4,], IgM [5] и IgE [6].

В данной работе мы использовали принципы иммуноферментного анализа для количественного определения IgA в сыворотке крови человека. Определение содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови дает ценную информацию о состоянии гуморального иммунитета человека и служит существенным дифференциально-диагностическим и прогностическим признаком при ряде заболеваний.

М е т о д и к а

IgA выделяли из глобулиновой фракции сыворотки крови больного IgA-миеломой. Глобулиновую фракцию сыворотки получали осаждением сульфатом аммония при 33% насыщении. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 0,05 М трис-HCl-буфере pH 8,6 с 0,1 М NaCl, диализовали против этого же буфера в течение ночи при 4°C и наносили на колонку 2,5×100 см с сефадексом G-200. Фракции по 3 мл собирали на автоматическом коллекторе фракций (фирма ЛКВ, Швеция). Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя для коэффициента экстинкции значение 13,4 [7].

Пероксидаза хрена была выделена из коммерческого препарата пероксидазы с RZ 0,6 (фирма «Реанал», Венгрия) методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации [8]. Для работы использовали фермент с RZ 3,3, дмогенный по данным аналитического центрифугирования. Ферментативную активность определяли по начальной скорости реакции о-дианизидина с перекисью водорода. Начальная концентрация о-дианизидина при измерении 10^{-4} м/л, перекиси водорода $1,3 \cdot 10^{-4}$ м/л. Скорость реакции регистрировали при 37°C на анализаторе скоростей реакции 2086 (фирма ЛКВ, Швеция) при 340 нм. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, используя значение коэффициента экстинкции $E_{10\%}^{1\text{см}}$, равное $9,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Комплекс IgA — пероксидаза получали методом окисления углеводного компонента фермента периодатом натрия [9]. 5 мг пероксидазы растворяли в 1 мл 0,3 М бикарбоната натрия pH 8,1 и добавляли 0,1 мл 1% раствора фтординитробензола в абсолютном этаноле. Перемешивали раствор при комнатной температуре в течение 1 ч и затем добавляли 1 мл 0,08 М периодата натрия pH 6,2. Инкубировали раствор при комнатной температуре в течение 30 мин и останавливали реакцию добавлением 1 мл 0,16 М этиленгликоля в воде. Смесь инкубировали в течение 1 ч и затем диализовали при 4°C против 0,01 М карбонатного буфера pH 9,5. К отдиализованному раствору модифицированного фермента добавляли 6 мг IgA человека в 0,2 мл трис-HCl-буфера pH 8,6. Смесь инкубировали в течение 2 1/2 ч при комнатной температуре и затем диализовали при 4°C против 0,01 М фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,1 М NaCl. Комплекс выделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-200 (1,5×100 см), уравновешенном 0,01 М фосфатным буфером с 0,1 М NaCl. Содержание IgA и пероксидазы во фракциях элюата определяли спектрофотометрически при 280 и 403 нм.

В работе использовали глобулиновую фракцию моноспецифической кроличьей антисыворотки к IgA человека, которую выделяли осаждением 20% водным раствором полиэтиленгликоля (мол. вес 4000). Осадок отделяли центрифугированием при 8000 об/мин, растворяли в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4 с 0,1 М NaCl и производили осаждение вторично. Выделенный второй раз осадок растворяли в том же фосфатном буфере и диализовали против него в течение ночи при 4°C. Антительную активность сыворотки контролировали методом двойной диффузии в гель. Если растворение осадка проводили в объеме, равном первоначальному объему сыворотки, то титры антител сыворотки и глобулиновой фракции совпадали.

Нормальная сыворотка крови человека и кроличьи антисыворотки к пероксидазе и белкам крови человека получены из института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи.

В качестве носителя для иммобилизации антител использовали силохром С-10 МК (диаметр пор 800—1000 Å) — неорганический пористый материал на основе двуокиси кремния, производства Всесоюзного научно-исследовательского института люминофоров (Ставрополь). Перед проведением иммобилизации носитель активировали [10] кипячением 10 г силохрома с 4% раствором γ-аминопропилтриэтоксисилана в безводном толуоле в течение 8 ч. Огмытый толуолом силохром сушили в течение 5 ч при 50°C и затем еще 5 ч при 120°C в вакуумной сушилке при 30 мм рт. ст. На второй стадии активации 1 г аминированного силохрома инкубировали с 10 мл 1% раствора глутарового альдегида в холодной дистиллированной воде в течение 4 ч. После окончания инкубации активированный носитель отмывали от избытка глутарового альдегида дистиллированной водой. Полноту отмывки контролировали спектрофотометрически при 280 нм.

Для иммобилизации глобулиновой фракции моноспецифической антисыворотки к IgA активированного силохрома в 10 мл 0,01 М фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,1 М NaCl и 0,025% тритона X-305 (тритон-фосфатный буфер), добавляли 100 мг белка и инкубировали смесь при перемешивании при комнатной температуре. Процесс связыва-

ния белка с силохромом контролировали спектрофотометрически при 280 нм. После прекращения изменения оптической плотности иммобилизованные антитела отмывали тритон-фосфатным буфером от несвязавшегося белка и хранили в этом же буфере при 4°C. Количество связавшегося с носителем белка определяли по разности начального количества белка и количества белка в промывных водах. При построении калибровочного графика для определения содержания IgA в инкубационные пробирки, содержащие по 3 мг сорбента, добавляли возрастающее количество IgA человека (от 10 до 10⁶ нг) и 0,2 мл комплекса, содержащих 350 нг пероксидазы. Объем доводили до 1 мл тритон-фосфатным буфером и инкубировали пробирки в течение 3 ч при комнатной температуре и скорости вращения 12 об/мин. После окончания инкубации определяли ферментативную активность в 0,5 мл надосадочного раствора.

Реакцию иммуноэлектрофореза выполняли в микромодификации в 1,2% агаре в 0,05 М веронал-мединаловом буфере pH 8,6. Седиментационный анализ проводили на аналитической ультрацентрифуге «Спинко Е» (фирма «Beckman») в роторе AND при 56 100 об/мин.

Результаты и обсуждение

Выделенный осаждением сульфатом аммония и гель-фильтрацией на сефадексе G-200 IgA человека был гомогенным по данным аналитического ультрацентрифугирования и имел коэффициент седиментации 7,1 S. Однако

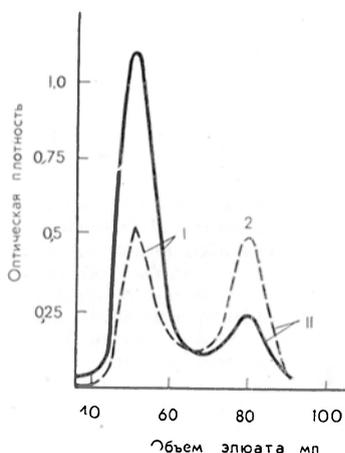


Рис. 1. Выделение комплекса IgA — пероксидаза.

I — комплекс; II — непрореагировавшая пероксидаза. I — оптическая плотность 280 нм; 2 — 403 нм. Колонка 1,5 × 100 см с сефадексом G-200, уравновешенным 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4 с 0,1 М NaCl.

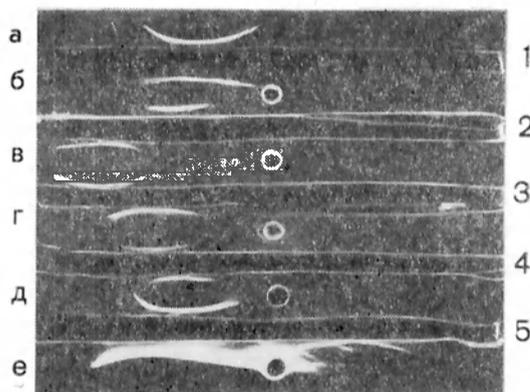


Рис. 2. Иммуноэлектрофореграмма IgA, пероксидазы и комплекса IgA — пероксидаза.

В лунках: а — IgA человека; б, д — комплекс IgA — пероксидаза; в — пероксидаза; г — пероксидаза, модифицированная периодатом натрия; е — нормальная сыворотка крови человека. В траншеях: 1 — моноспецифическая антисыворотка против IgA человека; 2—4 — кроличья антисыворотка к пероксидазе; 5 — кроличья антисыворотка к белкам крови человека.

в иммуноэлектрофорезе с антисывороткой к белкам крови человека была идентифицирована примесь IgG.

Выделенная глобулиновая фракция антисыворотки к IgA человека образовывала при иммуноэлектрофорезе одну линию преципитации с выделенным IgA и нормальной сывороткой крови человека. Титр глобулиновой фракции, определенный методом двойной диффузии в гель, был равен 1 : 16.

На рис. 1 приведена хроматограмма выделения комплекса IgA — пероксидаза. Пик I соответствует комплексу, пик II — непрореагировавшему ферменту. Из анализа хроматограммы следует, что 50 % вышедшей с колонки пероксидазы связано с IgA. Значительный выход комплекса является основным преимуществом данного метода связывания пероксидазы с иммуноглобулином. Максимальный выход комплекса, полученный при связывании пероксидазы с IgA через глутаровый альдегид, составил лишь 10 % [11].

Мольное соотношение фермент/IgA в пике I равно 1. По данным аналитического ультрацентрифугирования, выделенный комплекс седиментировал одним несимметричным пиком с коэффициентом седиментации 7,3S.

Эти данные свидетельствуют о том, что основная часть комплекса соответствует составу $(IgA)_1$ — (пероксидаза) $_1$.

Ферментативная активность комплекса составила 75 % от активности нативного фермента. Из приведенных на рис. 2 данных иммуноэлектрофоретического анализа следует, что комплекс сохранил способность к взаимодействию с антителами против IgA и пероксидазы. Приведенные на рис. 2 данные иммуноэлектрофореза пероксидазы, обработанной периодатом натрия, свидетельствуют о существенном увеличении электрофоретической подвижности модифицированного фермента по сравнению с нативным. Комплекс при проявлении антисыворотками к IgA, пероксидазе и белкам сыворотки крови человека преципитирует одной линией, что указывает на отсутствие в препарате, кроме IgA и пероксидазы, других антигенов. Но эти данные не могут служить однозначным доказательством отсутствия примеси комплексов пероксидазы с IgG, так как электрофоретическая подвижность гибридной молекулы отличается от подвижности свободной IgG и линии преципитации обоих комплексов при небольшой примеси IgG могут совпадать.

Попытка восстановить боргидридом натрия основание Шиффа между IgA и ферментом привела к расщеплению комплекса на фрагменты, которые были обнаружены после гель-фильтрации на сефадексе G-200. Боргидрид натрия является широко используемым реагентом для восстановления

связи $>C=N$ — в альдимидах. В работе [9] было показано, что восстановление этих связей боргидридом натрия положительно влияет на стабильность комплекса IgG — пероксидаза. Наблюдаемое нами образование фрагментов при взаимодействии боргидрида с комплексом, по-видимому, обусловлено расщеплением пептидных связей в молекуле IgA [12].

Комплекс IgA — пероксидаза при хранении в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4 с 0,1 М NaCl при 4°C полностью терял ферментативную и иммунохимическую активность через 6—8 сут после выделения. Процесс инактивации сопровождался агрегацией белка и выпадением осадка. Существенный эффект стабилизации наблюдался при получении комплексов с раствором IgA, предварительно термостатированным в течение 20 ч при 50°C. Полученные таким путем комплексы при хранении в фосфатном буфере pH 7,4 при 4°C полностью сохраняли ферментативную и иммунохимическую активность в течение 5 мес. Аналогичный эффект увеличения стабильности после прогрева иммуноглобулина или комплекса после выделения наблюдался нами и ранее при изучении свойств комплекса IgG — пероксидаза, полученного методом двухстадийного синтеза с использованием глутарового альдегида.

На рис. 3 приведен график, характеризующий процесс связывания глобулиновой фракции кроличьей антисыворотки к IgA человека с активированным силихромом С-10 МК. Максимальная емкость сорбента составила 50 мг белка на 1 г носителя. Мерой стабильности иммобилизованных антител служила способность сорбента связывать фиксированное количество комплекса IgA — пероксидаза. При хранении сорбента при 4°C в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4 с 0,1 М NaCl изменения активности антител не наблюдалось в течение 3 мес. Длительное сохранение активности иммобилизованными антителами является одним из условий, необходимых для практического применения иммуоферментного анализа. Приведенные данные

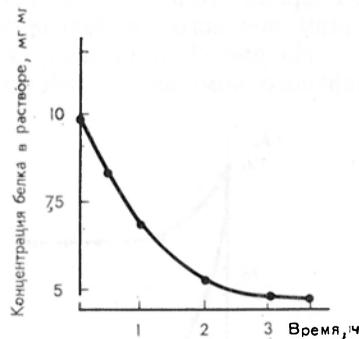


Рис. 3. Связывание глобулиновой фракции кроличьей антисыворотки с 1 г активированного силихрома С-10 МК.

Объем смеси 10 мл, температура 23°C, 0,01 М фосфатный буфер pH 7,4 с 0,1 М NaCl, содержащий 0,025% тритона X-305.

свидетельствуют о том, что примененные макропористый носитель и метод связывания пригодны для получения достаточно стабильных и активных препаратов иммобилизованных антител, которые могут быть использованы как для препаративного выделения антигенов, так и для аналитических целей. Применение глобулиновой фракции антисыворотки вместо выделенных антител позволяет упростить методику получения иммуносорбента и снижает стоимость анализа. Чувствительность определения при переходе от иммобилизованной глобулиновой фракции к чистым антителам меняется незначительно [13]. Отрицательным моментом использования глобулиновой фракции является возрастающая вероятность неспецифического связывания меченого и определяемого антигенов компонентами фракции.

На рис. 4 приведена зависимость от времени связывания иммуноферментного комплекса сорбентом с антителами к IgA человека (кривая 1) и

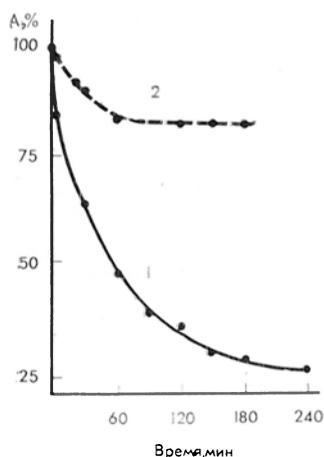


Рис. 4. Связывание комплекса IgA — пероксидазы (350 нг пероксидазы) сорбентом с антителами кролика к IgA человека (1) и сорбентом с антителами осла к белкам крови кролика (2)

A — ферментативная активность. Температура 22°C, 0,01 М фосфатный буфер pH 7,4 с 0,1 М NaCl, содержащий 0,025% тритона X-305.

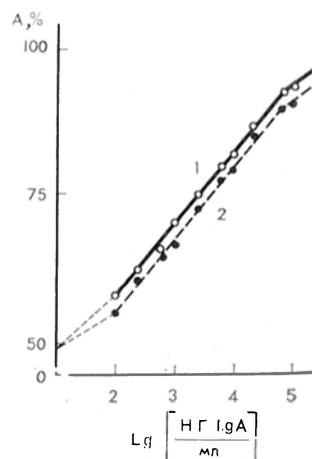


Рис. 5. Калибровочный график для количественного определения IgA в сыворотке крови человека.

A — ферментативная активность. 1 — выделенный препарат IgA; 2 — сыворотка крови человека. Значение точек взято как среднее по результатам 3 опытов.

сорбентом с антителами осла к сыворотке крови кролика (кривая 2). Кривая 2 отражает процесс неспецифического связывания комплекса на сорбенте. Из рис. 4 следует, что при данных условиях специфическое связывание комплекса сорбентом происходит в течение 3 ч, но часть комплекса сорбентом не связывается. При избытке антител остаточная ферментативная активность может объясняться наличием примеси комплекса IgG — пероксидаза. Вклад в этот фон может вносить также комплекс IgA — пероксидаза, в котором антиген утратил иммунологическую активность. Неспецифическая сорбция комплекса на сорбенте составила 15%.

Для проведения анализа использовали количество сорбента, необходимое для связывания 50—60% добавленного комплекса. На рис. 5 приведены калибровочные кривые, полученные с выделенным препаратом IgA и эталонной сывороткой крови человека, содержащей 0,97 мг/мл IgA. Метод дает возможность определять IgA в сыворотке крови в пределах концентраций 10^2 — 10^5 нг/мл. Средняя ошибка метода, вычисленная по результатам трех параллельных калибровок, составила 9%. Удовлетворительное соответствие калибровочных графиков для выделенного IgA и сыворотки ука-

зывает на сохранение высокой специфичности сорбента при работе в сложной, многокомпонентной системе.

При разработке аналитической системы для детекции какого-либо соединения оптимальным является сохранение высокой чувствительности при максимально возможном сокращении времени анализа. Когда в основе анализа лежит достижение равновесия реакции антиген — антитело, удовлетворительную оптимизацию обоих параметров получить трудно. По данным литературы, инкубацию компонентов при определении IgG и IgE в концентрации 10 нг/мл проводили в течение 16—24 ч [6, 13]. Концентрация IgA в сыворотке крови человека составляет более 1 мг/мл, поэтому для его определения не требуется работы в диапазоне предельных значений чувствительности системы. В связи с этим мы сочли целесообразным проводить определение при соотношении реагентов, не обеспечивающим максимальной чувствительности, снижая при этом время анализа до 3 ч. Вместе с тем применяемые для анализа концентрации комплекса дают возможность проводить измерение ферментативной активности за $1/2$ мин, используя автоматические методы регистрации начальной скорости реакции. Уменьшение времени определения и применение автоматических методов измерения являются существенными положительными факторами при проведении массовых анализов.

В настоящее время наиболее распространенным клиническим методом для количественной оценки иммуноглобулинов является метод радиальной иммунодиффузии [14]. Как следует из наших и литературных данных [5, 15], иммуноферментный анализ иммуноглобулинов в 100—1000 раз превосходит по чувствительности метод радиальной иммунодиффузии. Время, необходимое для проведения анализа, при работе по предлагаемой нами методике сокращается от 1 сут до 3 ч.

Чувствительность иммуноферментных методов определения белков и гормонов сравнима с чувствительностью радиоиммунного анализа. Применение радиоиммунологических определений ограничивается в основном необходимостью наличия специальных помещений и оборудования. Применение в качестве маркера молекулы фермента дает возможность проводить высокочувствительное определение белков и гормонов на базе оборудования, имеющегося практически во всех научных и клинических лабораториях.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Wisdom G. B.— Clin. Chem. 1976, v. 22, p. 1243—1255.— 2. Kuhlmann W. D.— In: Immunoenzymatic Techniques Ed. G. Feldmann et al. New York, 1976, p. 91—98.— 3. Avrameas S., Guilbert B.— Biochimie, 1972, v. 54, p. 837—842.— 4. Kato K., Hamaguchi Y., Fukui H. et al.— J. Biochem. (Tokyo), 1975, v. 78, p. 423—425.— 5. Stimson W. H., Sinclair I. M.— FEBS Letters, 1974, v. 47, p. 190—192.— 6. Hoffman D. R.— J. Allergy, 1973, v. 51, p. 303—307.— 7. Tomasi T. B., Grey H. M.— Progr. Allergy, 1972, v. 16, p. 81—213.— 8. Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М. и др.— Биохимия, 1975, т. 40, с. 297—301.— 9. Nakane P. K., Kawaoi A.— J. Histochem. Cytochem., 1974, v. 22, p. 1084—1091.— 10. Westall H. N.— Science, 1969, v. 166, p. 615—616.— 11. Егоров А. М. и др.— В кн.: Всесоюзная конференция по аналитической химии органических соединений (Сборник тезисов). 3-я. М., 1976, с. 29.— 12. Jakulis V., Costca N., Heller P.— J. Immunol., 1969, v. 102, p. 488—491.— 13. Engvall E., Jonsson K., Perlman P.— Biochim. biophys. Acta, 1971, v. 251, p. 427—434.— 14. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans I. P.— Immunochemistry, 1965, v. 2, p. 235—254.— 15. Kato K., Hamaguchi Y., Fukui H. et al.— FEBS Letters, 1975, v. 56, p. 370—372.

Поступила 13/IX 1977 г.

THE QUANTITATIVE ESTIMATION OF IMMUNOGLOBULIN A IN HUMAN BLOOD SERUM BY IMMUNOENZYMATIC ANALYSIS

B. B. Dzantiev, E. M. Gavrilova, A. M. Yegorov, M. B. Smirnova, I. V. Berezin

Chair of Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov State University, Moscow

A complex of immunoglobulin A (IgA) with peroxidase was obtained as a result of interaction of IgA with the enzyme, modified with sodium periodate. The molar ratio of IgA/peroxidase was equal to 1 in the complex, as shown by gel filtration and sedimentation analysis. Peroxidase maintained 75% of the initial activity in the complex. The antigenic and enzymatic properties of the complex were retained completely within 5 months, if the preparation was kept at 4° in phosphate buffer, pH 7.4. The complex isolated was used for quantitative estimation of IgA in human blood serum. The method is based on the reaction of competitive binding between free and labelled with peroxidase IgA molecules and antibodies, immobilized on inorganic porous carrier—sylochome. The method enables to estimate quantitatively IgA concentration within the limits of $10^2=10^6$ ng/ml.

УДК 616.5-008.939.629-074

Д. А. Лебедев

МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ОБМЕНА КОЛЛАГЕНА В КОЖЕ ЧЕЛОВЕКА

Институт ревматизма АМН СССР, Москва

Предложена модификация метода для изучения обмена коллагена в коже человека. Скорость биосинтеза и созревания коллагена определяли по радиоактивности оксипролина во фракциях растворимого и нерастворимого коллагена после 10-часовой инкубации биоптатов кожи в среде, содержащей ^{14}C -пролин. О степени распада коллагена судили по сопоставлению концентрации коллагена в коже и скорости его биосинтеза.

Отличия предложенного метода от оригинального заключается в методе определения содержания общего и радиоактивного оксипролина, в экстрагировании фракции коллагена, растворимой в 0,45 н. NaCl, в изменении состава и объема инкубационной среды, замене некоторых реактивов на менее дефицитные.

Предложенная модификация метода делает его более информативным, экономичным и доступным, сохраняя хорошую воспроизводимость и достаточную чувствительность.

Поиски методов, позволяющих выявить специфические нарушения обмена коллагена при различных заболеваниях, необходимы для совершенствования диагностики и выбора правильных принципов лечения.

Наиболее информативным, адекватно отражающим события *in vivo*, является метод прямого измерения обмена коллагена в биоптатах с использованием специфической радиоактивной метки [1]. Метод основан на том, что коллаген содержит оксипролин — уникальную для белков аминокислоту. Особенность химического состава коллагена позволяет судить о количестве образующегося коллагена по радиоактивности ^{14}C -оксипролина после инкубации биоптата кожи в среде, содержащей радиоактивный ^{14}C -пролин.

Молекулы коллагена секретируются во внеклеточную среду, объединяются в агрегаты, образуя в конце концов коллагеновые фибриллы. В этом процессе созревания коллагена образуется набор агрегатов различной молекулярной массы, молекулы которых объединены различным количеством поперечных связей и поэтому обладают различной растворимостью. Коллагеновая фракция, экстрагируемая нейтральным раствором низкой ионной силы, является наиболее ранней формой вновь синтезированного коллагена. Путем экстрагирования, например кислыми растворами, выделяют более зрелые фракции коллагена. Экстрагируя кожу буферными растворами различной ионной силы и pH после инкубации ее с ^{14}C -пролином, можно следить за «миграцией» метки во все менее растворимые фракции коллагена и таким образом определять скорость его созревания.

Сопоставляя концентрацию коллагена в коже со скоростью его биосинтеза, можно косвенно оценить уровень распада коллагена в коже.

В настоящей работе предложена модификация метода Уитто [1], которая делает его более информативным, экономичным и доступным сохраняя хорошую воспроизводимость и достаточную чувствительность.

Суммарная радиоактивность ^{14}C -оксипролина в растворимом и нерастворимом коллагене служила показателем интенсивности его биосинтеза. Скорость созревания коллагена оценивали по радиоактивности ^{14}C -оксипролина нерастворимой фракции коллагена. Сопоставление концентрации коллагена в коже и скорости его биосинтеза позволяло судить об интенсивности распада коллагена в биоптате.

Методы исследования

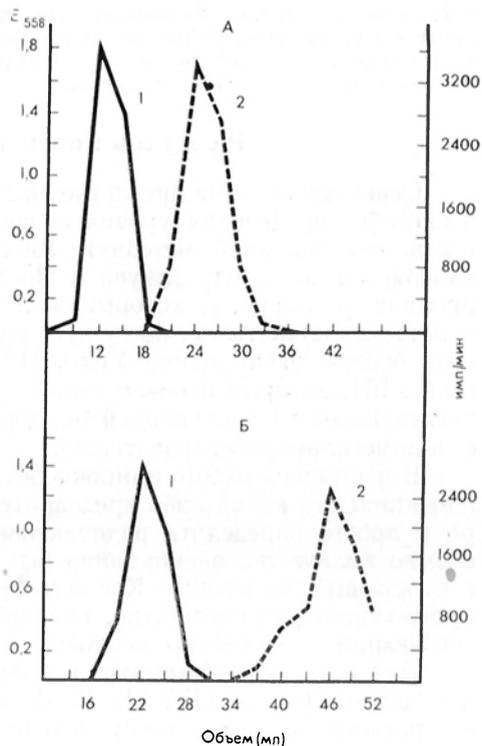
Материалы. Биоптаты кожи получали от хирургических больных, не имевших каких-либо признаков заболевания соединительной ткани. Исследовали ^{14}C -пролин (ЦССР) с удельной радиоактивностью 125 мкКи/ммоль, дауэкс 50W×8 (200—400 меш) «Serwa» (ФРГ). Остальные реактивы отечественного производства категории х. ч. и ч. д. а.

Приготовление образцов кожи и их инкубация. Из биоптатов осторожно удаляли подкожную жировую клетчатку, кожу взвешивали и разрезали микротомом на кусочки равной толщины (0,5 мм). Микротом представлял собой набор лезвий безопасной бритвы, зажатых между пластинами толщиной 0,5 мм. Срезы кожи помещали в круглодонную колбочку вместимостью 20 мл с 4 мл инкубационной среды. Инкубационная среда содержала бесфосфатный раствор Кребса — Рингера на 75 мМ трис-малеатном буфере pH 7,45, который содержал 30 мМ глюкозу; 0,05 мг/мл ампициллина и 1 мкКи/моль ^{14}C -пролин. Инкубацию проводили при 37°C в течение 10 ч при непрерывном встряхивании колбочек.

Выделение растворимой фракции коллагена. Биоптаты отделяли от инкубационной среды на стеклянном фильтре и промывали 20 мл дистиллированной воды. Инкубационную среду и фильтрат объединяли, переносили в целлофановые мешочки и диализовали на холоду в течение 2 сут против 0,1 М раствора уксусной кислоты и в течение 2 сут против дистиллированной воды. В дальнейшем диализат объединяли с фракцией растворимого коллагена. Отмытые образцы кожи переносили в пробирку, добавляли 0,5 мл физиологического раствора и лиофилизировали. Высушенный образец взвешивали и, зная массу оставшейся соли, рассчитывали содержание воды в образце и его сухую массу. Гомогенизацию кожи проводили в гомогенизаторе при скорости 14 000 об/мин охлаждением в 7 мл экстрагирующего раствора (0,45 н. NaCl в 0,05 М трис-буфере pH 7,4), гомогенизатор промывали 2 раза 7 мл того же раствора. Из гомогената (общим объемом 21 мл) проводили экстракцию коллагена 24 ч на холоду при встряхивании.

Гомогенат центрифугировали при 35 000 g в течение 1 ч. Из осадка дважды, описанным способом, экстрагировали коллаген 7 мл экстрагирующего раствора. Полученный экстракт диализовали в течение 2 сут против дистиллированной воды, после чего объединяли с отдиализованной инкубационной средой. К этому раствору приливали равный объем 12 н. HCl, а к осадку, содержащему нерастворимый коллаген, 6 н. HCl, запаивали в ампулы и гидролизовали при 120°C в течение 16 ч. Гидролизаты разбавляли водой в 3 раза и выпаривали в фарфоровых чашках на водяной бане.

Разделение пролина и оксипролина. Иминокислоты разделяли хроматографически на колонках со смолы дауэкс 50W×8 (200—400 меш). Условия разделения иминокислот были подобраны следующим образом. На колонку с ионообменником размерами 1×5 и 1×9 см наносили 3 мл раствора, содержащего смесь 75 мМ оксипролина и 0,65 ммоль/мл ^{14}C -про-



Хроматографическое разделение иминокислот на колонках с дауэкс 50W×8.

А — колонка 1×5 см; Б — 1×9 см. 1 — фракция оксипролина; 2 — фракция ^{14}C -пролина.

лина. Колонку промывали 2 раза 4 мл воды. Элюцию иминокислот проводили 1 н. HCl, собирая фракции по 3 мл в фарфоровые чашки. Фракции выпаривали на водяной бане, растворяли в 1 мл воды и отбирали по 0,2 мл для определения в них количества оксипролина и радиоактивного пролина. Уровень оксипролина определяли методом Бергмана и Локсли [2]. Результаты опыта представлены на рисунке. Видно, что на колонке размером 1×5 см происходит полное разделение иминокислот.

Радиоактивный пролин при инкубации с кожей более чем на 90% включается в коллаген [3]. Тем не менее определенная его часть может обнаруживаться в низкомолекулярных радиоактивных соединениях. Для удаления возможных примесей низкомолекулярных радиоактивных соединений исследуемые фракции коллагена подвергали длительному диализу. Возможно, также, что часть радиоактивной метки могла быть включена в высокомолекулярные вещества, которые послужили бы источником примесей в получаемой из гидролизата фракции оксипролина. Чтобы проверить чистоту этой фракции, был проведен ее анализ методом хроматографии в тонком слое на пластинках «Силуфол». Был выявлен один пик радиоактивности, соответствующий оксипролину.

Для разделения пролина и оксипролина в гидролизатах биоптатов выпаренные в фарфоровых чашках гидролизаты растворяли в 3 мл воды и через фильтр наносили на колонку. Фарфоровые чашки промывали 2 раза 4 мл воды и промывные воды также наносили на колонку, после чего проводили элюцию 1 н. HCl.

Фракцию 16 по 33 мл выпаривали в фарфоровой чашке на водяной бане. Сухой остаток фракции оксипролина нерастворимого коллагена растворяли в 1,5 мл воды и отбирали 2 пробы по 0,1 мл. В этих пробах после их разведения в 50 и 100 раз определяли содержание оксипролина. Радиоактивность ^{14}C -оксипролина измеряли, прибавляя к оставшимся 1,3 мл раствора 10 мл сцинтилляционной смеси Брея [14]. Во фракции растворимого коллагена определяли только радиоактивность ^{14}C -оксипролина. Истинное число импульсов в 1 мин вычисляли методом отношения каналов.

Результаты и обсуждение

Основные отличия предлагаемого метода от оригинального заключаются в способе определения уровня общего и радиоактивного оксипролина. Согласно оригинальной методики Уитто [1], радиоактивность оксипролина измеряется по методу Джува и Прокопа [5], т. е. путем окисления оксипролина до пиррола, который экстрагируется толуолом и очищается на колонке с силикагелем, после чего определяется его радиоактивность. Уровень общего оксипролина Уитто [1] определяли по методу Кивирикко и соавт. [6], который основан также на окислении оксипролина в пиррол с последующей его экстракцией толуолом и определением по цветной реакции с *n*-диметиламинобензальдегидом.

В настоящей работе иминокислоты непосредственно разделяли на ионообменнике без какой-либо предварительной обработки, что позволяет быстро и просто определить радиоактивность оксипролина. Для определения общего количества оксипролина был использован метод Бергмана и Локсли, который, по мнению Креля и Фурцевой [7], является лучшим по воспроизводимости результатов, наиболее простым по технике выполнения и требующим значительно меньшего расхода реактивов (хлорамина Т).

Для инкубации биоптатов использовали *трис*-малеатный буфер вместо дефицитного буфера НЕРЕС. Лиофилизация образцов позволила проводить все расчеты на сухую массу, что повышает информативность полученных результатов.

Существенное отличие предлагаемой модификации заключается также в том, что скорость созревания коллагена оценивали по радиоактивности коллагена, экстрагируемого 0,45 н. NaCl раствором вместо 0,14 н. NaCl [1].

На основании работы, в которой путем экстрагирования различных фракций коллагена наблюдали за «продвижением» радиоактивной метки во все более «зрелые» его формы [8], мы предположили, что «фронт» радиоактивности синтезированного за 10 ч инкубации коллагена должен находиться за пределами растворимости в 0,45 н. NaCl. Можно было ожидать, что изменения в процессе созревания коллагена будут наиболее отчетливо отражаться на радиоактивности фракции, нерастворимой в 0,45 н. NaCl. Кроме этого, известно, что *in vivo* большая часть вновь синтезированного коллагена подвергается разрушению [9]. Поэтому желательнее определение более «зрелых» фракций коллагена, так как они более полно отражают

то его реальное количество, которое переходит в полимерный коллаген. Определение в коже человека скорости созревания по радиоактивности коллагена, нерастворимого в 0,45 н. растворе NaCl, повышает чувствительность оценки интенсивности этого процесса.

Проверка воспроизводимости разработанного нами метода демонстрируется результатами параллельного анализа 3 образцов одной биопсии кожи (табл. 1).

Совпадение результатов в параллельных пробах позволило считать, что предложенный метод определения скорости биосинтеза и созревания коллагена дает достаточно хорошо воспроизводимые результаты.

Таким образом, предлагаемая модификация делает метод Уитто более экономичным и доступным, сохраняя хорошую воспроизводимость и достаточную чувствительность.

Разработанным методом был изучен также метаболизм коллагена в коже людей, не страдавших какими-либо заболеваниями соединительной ткани. Результаты этих исследований приведены в табл. 2. Как видно из табл. 2, средняя скорость биосинтеза коллагена из расчета на 10 мг сухой массы кожи равняется 463 имп/мин за 10 ч. Близкий результат был получен ранее Уитто [1].

Данные по скорости созревания коллагена обнаруживают большую вариабельность по сравнению со скоростью его биосинтеза. У людей, скорость биосинтеза коллагена у которых относительно повышена, увеличена и скорость его созревания, но не прямо пропорционально, а более резко. Так, при увеличении биосинтеза с 220 до 879 имп/мин, т. е. в 4 раза, скорость созревания возрасла в 8 раз (соответственно 40 и 321 имп/мин) (см. табл. 2). Эти данные подтверждают высказанное ранее предположение о том, что изменению скорости биосинтеза коллагена будет соответствовать более выраженное изменение скорости его созревания.

Средняя концентрация коллагена, отнесенная к сухой массе кожи, равняется 51,6%, что хорошо совпадает с данными литературы [10].

Т а б л и ц а 1

Содержание коллагена, скорость его биосинтеза и созревания в 3 образцах одной биопсии кожи

Содержание коллагена, %	Скорость биосинтеза коллагена	Скорость созревания коллагена
	имп/мин на 10 мг	сухой массы кожи
50	323	60
47	356	60
50	337	55

П р и м е ч а н и я. 1. Содержание коллагена выражено в процентах к сухой массе кожи. 2. Скорость биосинтеза коллагена определяли по степени радиоактивности оксипролина, входящего в состав растворимой и нерастворимой фракции коллагена после 10-часовой инкубации. 3. Скорость созревания коллагена оценивали и по радиоактивности оксипролина нерастворимой фракции.

Т а б л и ц а 2

Содержание коллагена, скорость его биосинтеза и созревания в коже практически здоровых людей

Содержание коллагена, %	Скорость биосинтеза коллагена	Скорость созревания коллагена
	имп/мин на 10 мг сухой массы кожи	
45	879	321
49	756	197
35	413	137
50	354	78
49	338	58
64	260	48
65	253	56
57	222	40

П р и м е ч а н и е. Содержание, скорость биосинтеза и созревания коллагена определяли, как указано в табл. 1.

Если несмотря на относительное увеличение скорости биосинтеза и созревания коллагена его концентрация в коже не превышает норму, то это является косвенным свидетельством повышенного распада. Таким образом, предложенный метод позволяет оценить скорость биосинтеза, созревания и распада коллагена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Uitto J.— *Biochim. biophys. Acta*, 1970, v. 201, p. 438.— 2. Bergman G., Loxley R.— *Analyt. Chem.*, 1963, v. 35, p. 1961.— 3. Keiser H. R., Sjoerdsma A.— *Clin. chim. Acta*, 1969, v. 23, p. 341.— 4. Brau G. A.— *Analyt. Biochem.*, 1960, v. 1, p. 279.— 5. Juva K., Proskop D. J.— *Ibid.*, 1966, v. 15, p. 77.— 6. Kivirikko K. J., Laitinen O., Proskop D. J.— *Ibid.*, 1967, v. 19, p. 249.— 7. Крель А. А., Фурцева М. Н.— *Вопр. мед. химии*, 1968, № 6, с. 635.— 8. Jackson D. S., Bentley J. P.— *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1960, v. 7, p. 37.— 9. Мазуров В. И.— *Биохимия коллагеновых белков*. М., 1974.— 10. Laitinen O., Uitto J., Hannuksela M. et al.— *Ann. Clin. Res.*, 1969, v. 1, p. 64.

Поступила 27/IX 1977 г.

A MODIFIED METHOD FOR STUDY OF COLLAGEN METABOLISM IN HUMAN SKIN

D. A. Lebelev

Institute of Rheumatism, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Rate of collagen biosynthesis was evaluated by monitoring total radioactivity of ^{14}C -proline in soluble and insoluble collagen. The rate of collagen maturation was estimated by following radioactivity of ^{14}C -hydroxyproline in insoluble fraction of collagen. Correlation between the concentration of collagen in skin and the rate of its biosynthesis enabled to determine the rate of collagen degradation. The modified method differed from the original one in the procedure for estimation of total and radioactive hydroxyproline, in technique for extraction of collagen fractions, soluble in 0.45 M NaCl, in composition of experimental samples. Some reagents were substituted for more easily available analogues. The modified method, as compared with original one, was more informative, simple and less expensive, but maintained the good reproducibility and sensitivity of the original method.

УДК 616.133.33-008.9-074

М. А. Годлевска, А. Ф. Креггерс, Б. А. Пурия, Л. И. Слуцкий

ПРИМЕНЕНИЕ ДИСПЕРСИОННОГО АНАЛИЗА К ИЗУЧЕНИЮ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СТенок МАГИСТРАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ ГОЛОВЫ И МОЗГОВЫХ АРТЕРИЙ ЧЕЛОВЕКА

Рижский медицинский институт, Институт механики полимеров АН Латвийской ССР, Рижский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии

С помощью дисперсионного анализа изучены зависимости количественных показателей биохимического состава (эластин, коллаген, нефибриллярные белки, гликозаминогликаны) стенок магистральных артерий головы и мозговых артерий человека от локализации сосуда, возраста и вида цереброваскулярной патологии. Показана целесообразность приложения этого математического метода к решению подобного рода задач.

Количественная биохимическая характеристика стенок артерий, обеспечивающих кровоснабжение головного мозга, послужила объектом исследования лишь в единичных работах [1—3]. Этим работ оказалось достаточно для того, чтобы установить, что магистральные артерии головного мозга весьма переменчивы по количественному содержанию соединительнотканых компонентов (эластин, коллаген, нефибриллярные белки, в том числе гликопротеиды, гликозаминогликаны). Как и в других отделах артериальной системы [4—12], переменчивость этих показателей связана с

локализацией сосуда, возрастом и наличием патологических изменений, в частности изменений атеросклеротического характера.

Для объективной оценки конкретного значения каждого из этих факторов результаты биохимического исследования стенок магистральных артерий головы и мозговых артерий были обработаны с помощью дисперсионного анализа. Этот метод [13] позволяет оценить полученные данные как случайные, обусловленные влиянием случайных факторов, и систематические, в основе которых лежит влияние исследуемых факторов (локализация сосуда, возраст, вид патологии), и дать количественную оценку влияния каждого из факторов в отдельности.

Методика

Были исследованы артериальные сосуды 40 человек, не страдавших цереброваскулярной патологией («возрастная норма»), 13 человек с инфарктом мозга на почве закупорки магистральных артерий головы или мозговых артерий и 26 человек с субарахноидальными и паренхиматозными кровоизлияниями, вызванными разрывом стенки сосуда; в последней группе у 13 человек разрыв произошел без аневризмы и у 13 — на фоне аневризмы. В каждом случае исследованы общие сонные и внутренние сонные (экстракраниальная часть) артерии, основная артерия, средние и передние мозговые артерии. Используемые методы биохимического анализа подробно изложены в работах [14, 15]. Для каждого исследуемого показателя из общего числа полученных данных составляли многофакторный равномерный статистический комплекс [16]; данные обрабатывали на ЭВМ ЕС-10-20. Кроме того, были подсчитаны доверительные интервалы исследованных биохимических параметров [17]. Для проведения дисперсионного анализа исходные данные поменяли в специально составленные таблицы и на основе этих данных вычисляли арифметические средние и коэффициенты вариаций. Однородность дисперсий проверяли по критерию Кохрена [18]. Значимость влияния факторов оценивали путем сравнения показателей достоверности, полученных обработкой данных, с табличными значениями [16]. Были определены все возможные групповые арифметические средние, при подсчете которых устранили влияние 1 или сразу 2 факторов.

Результаты и обсуждение

Зависимость изученных биохимических показателей состава сосудистой стенки от каждого значимого фактора в отдельности показана на рис. 1—3. На рисунках представлена также величина Δ — значимость различия между двумя групповыми арифметическими средними. Если это различие равно или превышает Δ , то оно статистически существенно с достоверностью более 95%.

Наиболее выраженное влияние на состав стенки артерий оказывает их локализация (рис. 1). Концентрация эластина намного выше в стенках магистральных артерий головы, чем в мозговых артериях. Самая низкая концентрация эластина обнаружена в стенке средней мозговой артерии. Напротив, содержание коллагена выше в интракраниальных сосудах, особенно в основной и передней мозговых артериях. Различия в содержании нефибриллярных белков, условным показате-

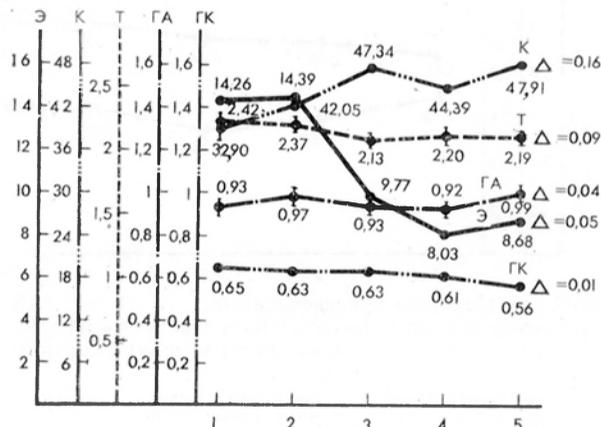


Рис. 1. Изменения биохимического состава (в г на 100 г сухого вещества) стенок магистральных артерий головы и мозговых артерий в зависимости от их локализации.

Здесь и на рис. 2 и 3: Э — эластин; К — коллаген; Т — тирозин; ГА — гексозамин; ГК — гексурононовые кислоты. Артерии: 1 — общая сонная, 2 — внутренняя сонная, 3 — основная, 4 — средняя мозговая, 5 — передняя мозговая.

телем которых служит концентрация в ткани тирозина, не столь велики, однако характер зависимости этого параметра от локализации сосуда напоминает зависимость эластина — концентрация тирозина выше в экстракраниальных артериях. Что касается гликопротеидных компонен-

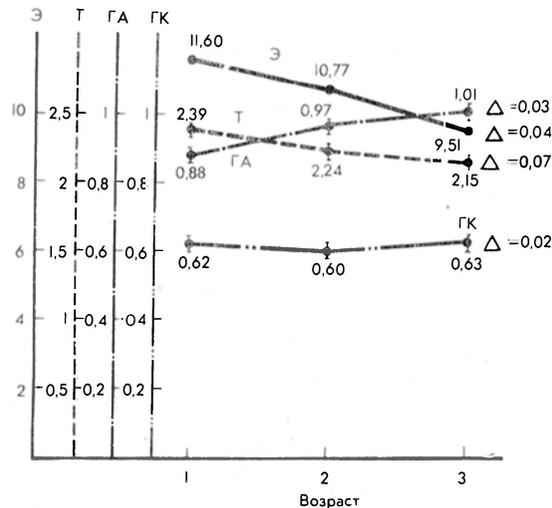


Рис. 2. Изменения биохимического состава (в г на 100 г сухого вещества) стенок магистральных артерий головы и мозговых артерий в зависимости от возраста.

1 — 1-я группа (от 18 до 35 лет); 2 — 2-я группа (от 36 до 50 лет); 3 — 3-я группа (от 55 лет).

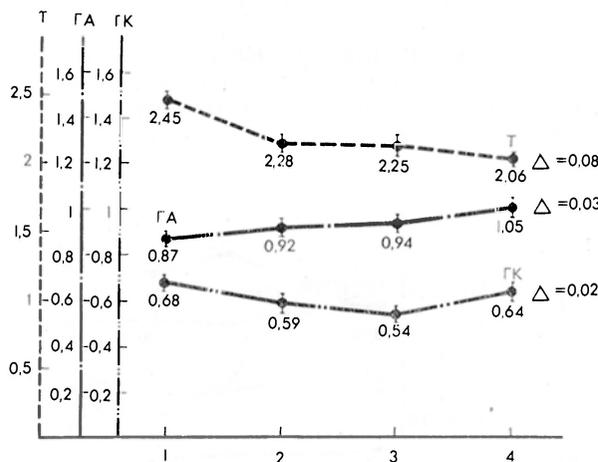


Рис. 3. Изменения концентрации (в г на 100 г сухого вещества) тирозина, гексозамина и гексуроновых кислот в артериях при сосудистых поражениях головного мозга.

1 — возрастная норма, 2 — закупорка сосудов, 3 — разрыв стенки сосуда, 4 — разрыв стенки аневризмы.

тов (показателем общего содержания гликопротеидов являются гексозамины, содержания гликозаминогликанов — гексуроновые кислоты), то можно отметить, что передняя мозговая артерия отличается самым высоким содержанием гексозаминов и самым низким — гексуроновых кислот.

Магистральные артерии головы отличаются от мозговых артерий своей гистологической структурой [19] и функциональными особенностями. Значительная деформативность магистральных артерий, отличающихся высоким содержанием эластина, обеспечивает демпфирование пульсовых колебаний артериального давления [20, 21]. За счет этого менее деформативные сосуды виллизиева круга [22], стенка которых богата коллагеном, испытывают лишь ослабленные пульсовые колебания. Различия биохимического состава экстра- и интракраниальных артерий согласуются с различиями в характере патологии, свойственной этим сосудам; мозговые артерии, в частности передние и средние мозговые артерии, особенно предрасположены к аневризматическим изменениям.

Под влиянием возраста (рис. 2) в стенках всех исследованных артерий значительно понижается содержание эластина и нефибриллярных белков (тирозины); резко возрастает содержание гликопротеид-

яют лишь на 3 биохимические показателя из числа исследованных. Концентрация нефибриллярных белков в стенке измененных сосудов снижена; наибольшей степени это снижение достигает в аневризматически измененных сосудах. При наличии сосудистой патологии понижено также содержание гликозаминогликанов. Эти данные могут служить дополнительным подтверждением точки зрения [3, 12] о важной роли нефибриллярных белков и гликозаминогликанов в формировании механических свойств сосудистой стенки. Общее содержание гликопротеидов (гексозаминов) под влиянием патологических изменений, напротив, увеличивается, достигая максимума в случае разрыва аневризмы. Очевидно, это изменение отражает накопление гликопротеидов, свойственное воспалительно-репаративным реакциям [14].

Удельный вес и значимость влияния отдельных факторов и их сочетаний (в %) на биохимические компоненты стенок артерий

Факторы	Эластин		Коллаген		Нефибриллярные белки		Гликопротеиды		Гликозаминогликаны	
	значимость влияния	удельный вес фактора	значимость влияния	удельный вес фактора	значимость влияния	удельный вес фактора	значимость влияния	удельный вес фактора	значимость влияния	удельный вес фактора
Сосудистые поражения	Незначимо	—	Незначимо	—	99,9	14,0	99,9	21,1	99,9	22,8
Локализация	99,9	69,0	99,9	25,1	99,9	9,7	95	7,0	99,9	8,3
Возраст	99,9	5,5	Незначимо	—	99,9	6,4	99,9	12,7	95,0	1,0
Сочетанное влияние факторов:										
патология и возраст	Незначимо	—	Незначимо	—	99,0	4,0	Незначимо	—	Незначимо	—
локализация и возраст	99,9	2,3	Незначимо	—	Незначимо	—	Незначимо	—	99,9	8,2
локализация и патология	99,0	2,0	99,9	10,5	Незначимо	—	99,9	10,4	99,9	12,0
локализация, возраст и патология	Незначимо	—	Незначимо	—	Незначимо	—	95	8,1	99,9	15,3
Незначимые, неучтенные факторы, разброс данных		21,2		64,4		65,9		40,75		33,3

Удельный вес и значимость влияния каждого из изученных факторов или их сочетаний (в процентах) на биохимический состав артериальной стенки представлены в таблице.

На концентрацию всех исследованных биополимеров ощутимо влияет локализация (экстра- или интракраниальная) сосуда; возраст оказывает заметное влияние на все показатели, за исключением коллагена. При наличии сосудистых поражений головного мозга оказываются измененными нефибриллярные белки, гликопротеиды, гликозаминогликаны.

Анализ влияния сочетаний факторов показывает, что сочетание локализации сосуда и патологических изменений значимо влияет на концентрацию эластина, коллагена, гликопротеидов и гликозаминогликанов; локализации сосуда и возрастного фактора — на содержание эластина и гликозаминогликанов. Сочетание возрастного фактора и патологических изменений отражается только на одном показателе — концентрации нефибриллярных белков. Сочетание всех 3 факторов, реально существующее в организме, влияет на общее содержание гликопротеидов и на содержание гликозаминогликанов.

Эти данные указывают на то, что содержание гликозаминогликанов и гликопротеидов в стенке артерий является наиболее лабильным и соответственно наиболее существенным из исследованных биохимических показате-

телей, — оно зависит как от изолированного влияния каждого из факторов в отдельности, так и от сочеганного их влияния. Наиболее высок удельный вес влияния сосудистой патологии (соответственно 22,8 % для гликозаминогликанов и 21,1 % для гликопротеидов). Этот факт хорошо согласуется с представлениями [8—11] об участии гликопротеидов и гликозаминогликанов в развитии патологических изменений артериальной стенки, в частности изменений атеросклеротического характера.

Таким образом, применение дисперсионного анализа позволило получить объективную количественную характеристику зависимости биохимического состава стенок магистральных артерий головы и мозговых артерий человека от таких факторов, как локализация сосуда, возраст и патологические изменения. Эта характеристика должна приниматься во внимание при дальнейшем изучении вопросов мозговой гемодинамики, возрастных изменений сосудов и патогенеза нарушений кровообращения головного мозга.

При биохимическом исследовании тканей человека очень часто возникают трудности в трактовке получаемых данных в связи с тем, что на изучаемые показатели влияет сложный комплекс факторов, а конкретная оценка роли этих факторов методом эксперимента невозможна. Поэтому применение математического подхода может оказаться во многих случаях весьма целесообразным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Накамура М., Яабута Н.— *J. atheroscler. Res.*, 1967, v. 7, p. 83.— 2. Fischer G. M., Himwich W. A.— *Brain Res.*, 1970, v. 18, p. 361.— 3. Годлевска М. А., Слуцкий Л. И., Пуриня Б. А.— *«Механика полимеров»*, 1974, № 6, с. 1096.— 4. Grant R. A.— *Biochem. J.*, 1965, v. 95, p. 53.— 5. Schmidt M., Dmochowski A.— *Acta biochim. pol.*, 1964, v. 83, p. 137.— 6. Nemeth-Csóka M.— *Acta histochem. (Jena)*, 1965, Bd 20, S. 65.— 7. Manley G., Hawksworth B.— *Nature*, 1965, v. 206, p. 1152.— 8. Berenson G. S., Radhakrishnamurthy B., Dalfieres E. R. jr., et a.— *Hum. Path.*, 1971, v. 2, p. 57.— 9. Anastassiades T., Anastassiades P. A., Denstedt O. F.— *Biochim. biophys. Acta*, 1972, p. 261, p. 418.— 10. Lindner J.— *Akt. Geront.*, 1974, Bd 4, S. 273.— 11. Stevens R. L., Colombo M., Gonzales J. J. et a.— *J. clin. Invest.*, 1976, v. 58, p. 470.— 12. Цедерс Э. Э., Слуцкий Л. И., Пуриня Б. А.— *«Механика полимеров»*, 1975, № 4, с. 722—729.— 13. Касьянов В. А., Крегерс А. Ф.— Там же, с. 704—711.— 14. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л., 1969, с. 373.— 15. Пуриня Б. А., Слуцкий Л. И., Касьянов В. А. и др. — *«Механика полимеров»*, 1974, № 2, с. 316—327.— 16. Леонтьев Н. Л. Техника статистических вычислений. М., 1966.— 17. Пустыльник Е. И.— *Статистические методы анализа и обработки наблюдений*. М., 1968.— 18. Налимов В. В. *Применение математической статистики при анализе вещества*. М., 1960.— 19. Шмидт Е. В. (ред.) *Сосудистые заболевания нервной системы*. М., 1975, с. 61—62.— 20. Годлевска М. А.— *«Труды Рижск. науч.-исслед. ин-та травматол. и ортопед.»*, 1975, вып. 13, с. 137—141.— 21. Лабадзе Т. С., Мчедлишвили Г. И.— Там же, с. 146—149.— 22. Самотокин Б. А., Хилько В. А. Аневризмы и артериовенозные соустья головного мозга. Л., 1973, с. 45—46.

Поступила 8/VI 1977 г.

APPLICATION OF DISPERSIONAL ANALYSIS FOR STUDY OF BIOCHEMICAL COMPOSITION OF WALLS OF HEAD MAIN ARTERIES AND OF HUMAN BRAIN ARTERIES

M. A. Godlevska, A. F. Kregers, B. A. Purinya, L. I. Slutsky

Medical School, Institute of Polymer Mechanics, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Institute of Traumatology and Orthopedics, Riga

In walls of head main arteries and in walls of human brain arteries quantitative biochemical parameters (content of elastin, collagen, nonfibrillar proteins, glycosamineglycans) dependent on vessel localization, age of a person and type of cerebrovascular pathology, were studied by means of dispersional analysis. The mathematical method proved to be suitable for solving of similar tasks.

СОДЕРЖАНИЕ

Ронинсон И. Б. и Народицкий Б. С. Изучение функциональной организации ДНК папса- и аденовирусов	579
Копнова Л. А. Фракционный состав кислых гликозаминогликанов аорты кролика при развитии гиперхолестеринемии	591
Носова И. М., Коткина Т. И., Заец Т. Л. Влияние кофтрикала на активность лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и их изоферменты в органах и тканях обожженных животных	595
Ваняев Б. И. Распределение радиоактивного фосфора (^{32}P) и интенсивность обмена АТФ в сердечной мышце крыс в условиях частичной парасимпатэктомии и физической нагрузки	600
Макевнина М. Г., Кудокочева Е. В., Добрецов Г. Е., Белоус А. М. Влияние низких температур на функциональное состояние мембран эндоплазматического ретикулаума печени	606
Бресткин А. П., Вязьменская М. М., Дембо М. А., Майзель Е. Б., Райхер И. И., Спиридонов М. Е., Фарцейгер А. Г. Некоторые свойства препаратов ацетилхолинэстеразы из эритроцитов человека	608
Хомулло Г. В., Травкина В. М., Рыжова Т. И., Кокорева Г. А. Состояние белкового и минерального обмена при введении тирокальцитонина в условиях экспериментального остеогенеза	609
Шенкман Б. З. Об инактивации тканями желудочно-кишечного тракта и печени серотонина в условиях дизентерийной интоксикации	617
Александрович А. Г., Ананьева Г. В., Димитрова А. И., Константинов А. А., Литонян З. М., Поступаев В. В., Степаненко Н. А., Фруентова Т. А., Щетинина Е. Г. О влиянии острой гипоксии на метаболическую активность легочной ткани	620
Саратиков А. С., Марина Т. Ф., Фисанова Л. Л. О механизме влияния салидрозида на обмен катехоламинов мозга	627
Киреев М. М., Конвай В. Д. Нуклеотидный фонд головного мозга крыс в различные периоды умирания организма	628

CONTENTS

Roninson, I. B., Naroditsky, B. S.: Studies of the Functional Organization of DNA of Papova- and Adenoviruses	579
Konnova, L. A.: The Fractional Composition of Acid Glycosaminoglycans from Rabbit Aorta in Hypercholesterolemia	591
Nosova, I. M., Kotkina, T. I., Zaets, T. L.: Effect of Contrical on Activity of Lactate and Malate Dehydrogenases in Tissues of Animals after Burns	595
Vaniayev, B. I.: Distribution of ^{32}P and ATP Turnover in Rat Myocardium in Partial Parasympathectomy and Physical Loading	600
Makevнина, M. G., Kudokotseva, E. V., Dobretsov, G. E., Belous, A. M.: Effect of Low Temperature on the Functional State of Membranes from Liver Endoplasmic Reticulum	606
Brestkin, A. P., Vyaz'menskaya, M. M., Dembo, M. A., Maysel, E. B., Raykher, I. I., Spiridonov, M. E., Fartzeyger, A. G.: Some Properties of Acetylcholinesterase from Human Erythrocytes	608
Khomullo, G. V., Travkina, V. M., Ryzhova, T. I., Kokoreva, G. A.: Effect of Thyrocalcitonine on Protein and Mineral Metabolism in Experimental Osteogenesis	609
Shenkman, B. Z.: Inactivation of Serotonin by Gastrointestinal and Liver Tissues in Dysenteric Intoxication	617
Alexandrovich, A. G., Anan'eva, G. V., Dimitrova, A. I., Konstantinov, A. A., Litonyan, Z. M., Postupaev, V. V., Stepanenko, N. A., Fruentova, T. A., Schetinina, E. G.: On the Effect of Acute Hypoxia on Metabolic Activity of Pulmonary Tissue	620
Saratikov, A. S., Marina, T. F., Fisanova, L. L.: On the Effect of Salidrasid on Turnover of Catecholamines in Brain	627
Kireev, M. M., Konvi, V. D.: Nucleotide Pool in Rat Brain of Dying Animals	628

- Воронков Г. В. Особенности элиминации адреналина и норадrenalина из крови крыс разного возраста 632
- Таранова Н. П. Включение 2-¹⁴С-ацетата в гликолипиды спинного и ствол головного мозга морских свинок в норме и в паралитической стадии интоксикации триортокрезил-фосфатом 636
- Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С., Арзанунц Э. М. Об активирующем действии индолилгидразидов на моноаминоксидазу мозга крыс 640
- Кулинский В. И. Использование определения активности катехол-о-метилтрансферазы для оценки состояния обмена катехоламинов у человека 645
- Верхратский Н. С. Особенности влияния ацетилхолина на биосинтез белка в отделах сердца взрослых и старых крыс 648
- Давыдова С. Я., Ветчинин С. С. Содержание циклических нуклеотидов, активность аденилатциклазы, фосфодиэстеразы 3',5'-АМФ и гуанилатциклазы в плазматических мембранах печени и гепатомах различной степени злокачественности 652
- Герасимова Е. Н., Глазунов И. С., Бодрова Е. А., Сучкова С. Н., Зыкова В. П., Бурлуцкий Г. И., Перова Н. В., Чернышова Н. П., Задоя А. А. Изменения количества гормонов в плазме крови и факторы риска ишемической болезни сердца у мужчин в возрасте 40—59 лет 657
- Филиппова В. Н., Филановская Л. И., Блинов М. Н., Ушакова Е. А. Изменение термостабильности АМФ- и ИМФ-пирофосфорилазы лейкоцитов при лейкозах 666
- Попов А. В., Кузнецов А. С., Лозовский В. Т. Гликозаминогликаны в составе липид-белковых комплексов аорты человека 670
- Головенко Н. Я. Синтез аминоглюкуронидов в организме белых крыс. Зависимость процесса от физико-химических свойств субстрата 676
- Спиричев В. Б., Блажевич Н. В., Богословский Н. А., Самохвалов Г. И., Авакумов В. М., Исаева В. А., Поздняков А. Л., Соколова С. К., Переверзева О. Г., Рязанцева Л. Д., Соколова С. В., Фернандес Р. Регладо. Сравнительное изучение биологической активности и токсического действия 1 α -оксихолекальциферола и эргокальциферола на крысах 679
- Розе Л. В., Розенфельд Е. Л., Влияние биогенных аминов на фосфорилиз и γ -аминолиз глико-
- Voronkov, G. V.: Elimination of Adrenaline and Noradrenaline from Blood of Rats of Various Age
- Taranova, N. P.: Incorporation of 2-¹⁴C-acetate into Glycolipids of Guinea Pig Brain and Spinal Cord in Normal and in Paralytical State, Caused by Tri-0-Cresyl Phosphate Intoxication
- Safrazbekyan, R. R., Sukasyan, R. S., Arzanuntz, E. M.: On the Activating Effect of Indolyl Hydrazides on Monoamine Oxidase from Rat Brain
- Kulinsky, V. I.: Significance of the Data on the Activity of Catechol-O-Methyl Transferase for Evaluation of Human Catecholamine Turnover
- Verkhratsky, N. S.: Effect of Acetylcholine on Protein Biosynthesis in Heart of Adult and Old Rats
- Davydova, S. Ya., Vetchinin, S. S.: Content of Cyclic Nucleotides, Activity of Adenylate Cyclase, 3'5'-AMP Phosphodiesterase and of Guanylate Cyclase in Plasmatic Membranes of liver Tissue and Hepatomas with Various Level of Malignancy
- Gerasimova, E. N., Glasunov, I. S., Bodrova, E. A., Suchkova, S. P., Zyкова, V. P., Burlutsky, G. I., Perova, N. V., Chernysheva, N. P., Zadoya, A. A.: Alterations in Content of Hormones in Blood Plasma and Factors of Risk of Heart Ischemic Impairments in 40-59 Years old men
- Filipova, V. N., Filanovskaya, L. I., Blinov, M. N., Ushakova, E. A.: Alteration in Thermostability of AMP- and IMP-Pyrophosphorylases from Leukocytes in Leukoses
- Popov, A. V., Kuznetsov, A. S., Losovsky, V. T.: Glycosaminoglycans Occurring in Lipoprotein Complex of Human Aorta
- Golovenko, N. Ya. Synthesis of Aminogluconides in Rats. Dependence of the Proces on the Physico-Chemical Properties of the Substrate
- Spirichev, V. B., Blazhevich, N. V., Bogoslovsky, N. A., Samokhvalov, G. I., Avvakumov, V. M., Isaeva, V. A., Pozdnyakov, A. L., Sokolova, S. K., Perevertzeva, O. G., Ryazantseva, L. D., Fernandes R. Reglado R.: Comparison of Biological Activity and Toxic Effect of 1 α -Hydroxycholecalciferol and Ergocalciferol in Rats
- Rose, L. V., Rosenfeld, E. L.: Effect of Biogenic Amines on Phosphorolysis and γ -Amylolysis of Glycogen in

- гена в сердечной мышце крысы при анестезии 690
- Александрова С. С., Никольская И. И., Дебов С. С. Фракционирование и очистка ферментов метилирования ДНК из клеток *Escherichia coli* СК на фосфоцеллюлозе Р-11 694
- Линицкая Г. Л., Яцына А. А., Пушкарская Н. Л., Галегов Г. А. Влияние рибовирина (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксимид) на индукцию РНК-зависимой РНК-полимеразы и образование вирусспецифических полисом в культуре клеток, инфицированных вирусом гриппа А 699

Методы биохимических исследований

- Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М., Егоров А. М., Смирнова М. Б., Березин И. В. Количественное определение иммуноглобулина А в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа 702
- Лебедев Д. А. Метод изучения обмена коллагена в коже человека 702
- Годлевская М. А., Креггерс А. Ф., Пурина Б. А., Слуцкий Л. И. Применение дисперсионного анализа к изучению биохимического состава стенок магистральных артерий головы и мозговых артерий человека 712

Rat Heart Muscle under Anesthesia

- Alexandrova, S. S., Nikol'skaya, I. I., Debov, S. S.: Fractionation and Purification of the Enzymes. Methylating DNA in Cells of *Escherichia coli* SK, Using Phosphocellulose P-11 694
- Linitskaya, G. L., Yatsina, A. A., Pushkarskaya, N. L., Galegov, G. A. Effect of Ribovirina (1-β-D-Ribofuranosyl — 1,2,4 — Triazol — 3 — Carboximide) on Induction of RNA — dependent RNA Polymerase and Formation of Virus Specific Polyosomes in Cell Culture Infected with Influenza A Virus 699

Methods of Biochemical Investigation

- Dzantiev, B. B., Gavrilov, E. M., Yegorov, A. M., Smirnova, M. B., Berezin, I. V.: The Quantitative Estimation of Immunoglobulin A in Human Blood Serum by Immunoenzymatic Analysis 702
- Lebedev, D. A.: A modified Method for Study of Collagen Metabolism in Human Skin 702
- Godlevska, M. A., Kreggers, A. F., Purinya, B. A., Slutsky, L. I.: Application of Dispersional Analysis for Study of Biochemical Composition of Walls of Head Main Arteries and of Human Brain Arteries 712

Техн. редактор *И. К. Арибжанова*

Корректор *Л. П. Тарина*

Сдано в набор 17/VII 1978 г. Подписано к печати 18/VIII 1978 г. Формат бумаги 70×108^{1/16}.
печ. л. 9,0 (условных 12,60 л.) уч.-изд. л. 13,55 Тираж 2049 экз. Заказ 1726

Издательство «Медицина». Москва, Петроверягский пер. 6/8.
Чеховский полиграфический комбинат Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области

Вниманию специалистов!

**ИЗДАТЕЛЬСТВО «МЕДИЦИНА» С ЯНВАРЯ 1979 г. ИЗДАЕТ
«БЮЛЛЕТЕНЬ ВСЕСОЮЗНОГО КАРДИОЛОГИЧЕСКОГО
НАУЧНОГО ЦЕНТРА АКАДЕМИИ
МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР»**

В журнале освещаются наиболее существенные результаты исследований по теоретической и клинической кардиологии, проводимых во Всесоюзном кардиологическом научном центре АМН СССР. Публикуются краткие обзоры о состоянии и перспективах исследований по важным направлениям современной кардиологии, а также лекции. Находят отражение данные о новых отечественных и зарубежных лекарственных препаратах и аппаратуре. Публикуются сообщения о конференциях и симпозиумах, проводившихся во Всесоюзном кардиологическом научном центре АМН СССР, кардиологических съездах и конгрессах, проходивших в Советском Союзе, а также о международных кардиологических конгрессах и конференциях. Помещаются сведения о новых книгах по кардиологии.

Оригинальные статьи каждого выпуска журнала посвящаются в основном одной из проблем кардиологии. В журнале публикуются также актуальные работы советских ученых, проводящих исследования по кардиологии в других учреждениях страны, и работы ведущих зарубежных ученых.

Содержание журнала и резюме оригинальных статей дается на английском языке.

Журнал рассчитан на кардиологов, терапевтов, педиатров, патофизиологов, биохимиков, патологоанатомов и других специалистов, интересующихся проблемами кардиологии.

Периодичность — 2 номера в год

Подписная цена на год — 3 руб.

В розничную продажу не поступает