

Е. А. Козлов, О. П. Петрий

ИММОБИЛИЗОВАННАЯ АСПАРАГИНАЗА И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МЕДИЦИНЕ

Лаборатория энзимологии АМН СССР, Москва

Ферменты в настоящее время находят широкое применение во многих областях медицины — в клинических исследованиях, диагностике и терапии [1]. Значительный интерес представляет использование ферментов в клинической онкологии. Хотя первая попытка в этом направлении была предпринята еще в начале нашего века [2], значительное развитие эта область химиотерапии получила только в последние 10—20 лет. Перед химиотерапией злокачественных заболеваний стоит задача не только разрушения раковых клеток, но и устранения тех первичных нарушений регуляции обмена в организме, которые приводят к образованию популяции раковых клеток. Поэтому внимание онкологов было привлечено к ферментам, так как они обладают существенными преимуществами перед другими химическими агентами, а именно строго избирательным действием. Было обнаружено, что противоопухолевой активностью в той или иной степени обладают аспарагиназа, α -амилаза, аргиназа, глутаминаза, трипсин, химотрипсин, фибринолизин, гилауронидаза, лактатдегидрогеназа, лизоцим, цистеин-десульфогидраза, глюкуронидаза, карбоксипептидаза, фосфолипаза, дезоксирибонуклеаза, рибонуклеаза и др. [3—7].

Из этого ряда ферментов наиболее эффективной и поэтому наиболее изученной оказалась аспарагиназа [8—14]. Клиническое изучение аспарагиназы *E. coli* показало, что препарат обладает выраженным противолейкозным действием при острой лимфобластической лейкемии человека, менее выраженной активностью при нелимфоцитарной лейкемии и низкой активностью при ретикуло- и лимфосаркомах. Терапевтический эффект аспарагиназы можно объяснить тем, что под действием фермента происходит резкое снижение концентрации аспарагина в кровотоке и нарушается синтез белка в опухолевых клетках, неспособных к синтезу аспарагина. Это приводит к подавлению синтеза ДНК и РНК, торможению роста и в конечном счете к гибели популяции [12].

Основной причиной, препятствующей широкому медицинскому применению аспарагиназы, а также других ферментов, вводимых парентерально, является иммунологическая несовместимость ферментного белка с тканями человека, которая приводит к развитию нежелательных и опасных аллергических осложнений, наблюдаемых приблизительно в 20 % случаев. Кроме того, образование антител к аспарагиназе вызывает снижение ее эффективности из-за увеличения скорости выведения фермента из кровотока. Избежать образования антител возможно, применяя для лечения иммунологически различные ферменты или используя препараты фермента, которые лишены иммунных свойств [15, 16]. Для преодоления иммунологической несовместимости в настоящее время также предложено использовать вместо нативных ферментов так называемые иммобилизованные ферменты, т. е. их нерастворимые или растворимостабилизированные производные. В литературе описано большое количество методов связывания

ферментов с твердым носителем, созданы разнообразные матрицы, получено несколько сотен нерастворимых производных ферментов и показана возможность их многократного и длительного использования. Иммобилизованные ферменты нашли применение в медицине, аналитической химии и ряде биорганических синтезов [17].

Т а б л и ц а 1

Методы иммобилизации аспарагиназ

| Источник аспарагиназы | Носитель | Реагент для активации | Выход или удельная активность | Источник литературы |
|------------------------|------------------------|-------------------------------|---|---------------------|
| Физическая адсорбция | | | | |
| <i>B. cadaveris</i> | Карбоксиметилцеллюлоза | — | 30—40% | [33] |
| То же | ДЭАЭ-целлюлоза | — | 100% | [23] |
| | Нержавеющая сталь | Окись титана | — | [15] |
| Ковалентное связывание | | | | |
| <i>E. coli</i> | Карбоксиметилцеллюлоза | Карбодиимид | 37,3 ед/мг | [34] |
| То же | Целлюлоза | р. Вудворда | 8 ед/мг | [34] |
| » » | Аминоэтилцеллюлоза | Бромциан | 75 ед/мг | [34] |
| » » | » | Глутаровый альдегид | 50% | [32] |
| » » | » | Карбодиимид | 4,1% | [32] |
| » » | Карбоксиметилдекстран | Гидразин | 13,4 ед/м | [34] |
| <i>Ps. fluorescens</i> | Сефароза 4 В | Бромциан | 50—60 ед/мг | [24] |
| <i>E. coli</i> | Полиметил-метакрилат | То же | 46%, 148 мед/см ² | [19, 47] |
| <i>Er. carotovora</i> | Нейлоновая трубка | » » | 25%, 32 мед/см ² | [43, 48] |
| <i>E. coli</i> | То же | » » | 3, 18 моль аспарагиновой кислоты в 1 мин на 1 м трубки при скорости 1,8 мл/мин и 37°C | [20, 21, 22] |
| То же | Стекло | 1-фтор-2-нитро-4-азидо-бензол | 1450 ед/г | [30] |
| » » | » | Глутаровый альдегид | 23% | [31] |
| » » | » | Азотистая кислота | 20% | [31] |
| » » | » | Карбодиимид | 0 | [31] |
| <i>E. coli</i> | Силикагель КСК | Глутаровый альдегид | 42% | [31] |
| | То же | Азотистая кислота | 23% | [31] |
| | » » | Карбодиимид | 3% | [31] |
| <i>E. coli</i> | Силохром С-80 | Глутаровый альдегид | 50% | [31] |
| | То же | Азотистая кислота | 22% | [31] |
| | » » | Карбодиимид | 3% | [31] |
| | Дакроновое волокно | Глутаровый альдегид | 37 ед/г | [18, 45, 49] |
| | Фибриновый полимер | Фактор XIII свертывания крови | 50% | [50] |
| | Альбумин | Глутаровый альдегид | 80% | [36] |
| | Коллаген | Глутаровый альдегид | 200 ед/г | [32, 51, 46] |
| Гель-включение | | | | |
| <i>P. vulgaris</i> | Полиакриламид | — | 20—30% | [19, 25, 28, 38,] |
| | Полиоксизтилметакрилат | — | | [54, 53] |

| Источник аспарагиназы | Носитель | Реагент для активации | Выход или удельная активность | Источник литературы |
|------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------|
| То же » » | Эритроциты Липосомы | — — | 20% — | [54] [55] |
| Микрокапсулирование | | | | |
| E. coli P. vulgaris | | | 35% | [26, 37, 56—60] |

В настоящем обзоре изложены различные методы иммобилизации аспарагиназы, подробно рассмотрены биохимические свойства иммобилизованных препаратов и обсуждены результаты исследования их биологической активности в эксперименте на животных и в клинике.

Методы иммобилизации аспарагиназ. Все методы иммобилизации аспарагиназ, известные в настоящее время, представлены в табл. 1. Их можно разделить, как принято в литературе, на четыре основные группы: 1) иммобилизация с помощью адсорбции на поверхности носителя; 2) включение аспарагиназы в гелевые структуры; 3) включение аспарагиназы в полупроницаемые микрокапсулы; 4) иммобилизация с образованием ковалентной связи между ферментом и натуральным или синтетическим носителем.

Результаты, получаемые обычно при иммобилизации ферментов, зависят от многих факторов, таких, как свойства фермента, свойства носителя, метод синтеза, условия проведения реакции. Это создает трудности для сравнения между собой различных методов и выбора оптимального метода иммобилизации. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки.

Первые три группы указанных выше методов относятся к физическим методам иммобилизации, при которых не происходит образования ковалентной связи между матрицей и белковой молекулой. Особенно важно, что в ферменте при этом не происходит ни химических, ни конформационных изменений. Кроме того, при заключении аспарагиназы в поры поперечно сшитого геля или в полупроницаемую микрокапсулу исключается всякое взаимодействие фермента с носителем и он становится недоступным для инактивирующего действия микроорганизмов и протеаз.

Как видно из табл. 1, большинство авторов отдают предпочтение методу ковалентного связывания аспарагиназы с носителем. Большим преимуществом этого метода является то, что фермент, как правило, не переходит в раствор даже при очень длительном использовании. Однако надо помнить, что образование химической связи между активированными группами носителя и реакционно-способными группами аминокислотных остатков фермента часто приводит к частичной, а иногда и к полной его инактивации. Путем подбора соответствующего носителя и метода образования ковалентной связи можно значительно уменьшить неблагоприятное влияние матрицы на фермент и тем самым повысить удельную активность иммобилизованного фермента.

Необходимо отметить, что к носителям ферментов, применяемых в медицине, особенно при их контакте с живым организмом, предъявляются большие специфические требования. Носители ферментов должны обладать высокой чистотой и однородностью, не должны оказывать раздражающего, токсичного и канцерогенного действия на организм [17].

Свойства иммобилизованных аспарагиназ. В процессе иммобилизации ферментов может изменяться вторичная, третичная и четвертичная структура фермента и происходит модификация его функциональных групп. Кроме того, поскольку иммобилизованные ферменты являются гетерогенными катализаторами, на их активность заметное влияние оказывают про-

цессы внешней и внутренней диффузии. Эти процессы могут влиять на концентрацию субстрата, ингибиторов, ионов водорода и других эффекторов в среде носителя и, следовательно, на основные биохимические свойства ферментов. При изучении иммобилизованных аспарагиназ большое внимание было уделено исследованию их каталитической активности и стабильности.

Влияние иммобилизации на сродство аспарагиназ к субстратам. Кинетика реакции дезамидирования аспарагина, катализируемой иммобилизованными аспарагиназами, исследовалась довольно подробно в ряде работ и характеризовалась константой Михаэлиса (K_m). Были найдены различия в поведении свободного и иммобилизованного ферментов, что объяснено указанными выше причинами. Для аспарагиназы *E. coli*, ковалентно связанной с дакроновым сосудистым протезом, K_m определялась для различных субстратов [18]. Было обнаружено значительное снижение сродства иммобилизованной аспарагиназы к основному субстрату L-аспарагину ($1,2 \cdot 10^{-5}$ М для свободного фермента и $2,0 \cdot 10^{-3}$ М для связанного фермента), а также к глутамину, β -циано-L-аланину, диазооксо-L-норвалину (ДОНВ). С другой стороны, для некоторых субстратов — DL-аспартил- β -гидразида, L-аспартил- β -гидроксамата — K_m заметно не уменьшается, а для D-аспарагина и D-глутамина даже увеличивается. По мнению авторов, наблюдаемое снижение сродства к L-аспарагину объясняется участием ионизируемых групп фермента в реакции связывания с дакроном, а не влиянием заряда матрицы. Они основывают этот вывод на том, что при изменении рН от 3,8 до 9,0 величина K_m аспарагина для свободного фермента уменьшается в 50 раз, а для иммобилизованного — только в 2—3 раза.

Увеличение относительных скоростей гидролиза стереоизомеров аспарагина и глутамина в широком интервале неденатурирующих температур (2—56°C) позволило авторам прийти к заключению, что наблюдаемые изменения стереоспецифичности связаны с изменением конформации активного центра аспарагиназы в процессе иммобилизации.

Скорость гидролиза L-аспарагина есть непосредственная функция скорости протекания субстрата. Быстрое прохождение субстрата подвергает каталитический центр непрерывному контакту с L-аспарагином и также удалению продуктов реакции — аммиака и L-аспарагиновой кислоты, которые являются относительно сильными ингибиторами аспарагиназы. Было проведено сравнительное изучение влияния скорости протекания, связанной с дакроном аспарагиназы на K_m . K_m в неподвижном растворе составляла $3 \cdot 10^{-5}$ М, при перемешивании K_m становилась порядка $3 \cdot 10^{-3}$ М.

Ковалентное связывание аспарагиназы с полиметилметакрилатом также приводит к заметному снижению ее сродства к L-аспарагину. Аспарагиназы из *E. coli* и *Erwinia caratovora*, иммобилизованные на этой матрице, имеют K_m соответственно $6,31 \cdot 10^{-4}$ и $4,69 \cdot 10^{-4}$ М, что приблизительно в 50 раз выше, чем K_m для нативных ферментов [19]. С другой стороны, при иммобилизации не происходит заметного изменения относительных скоростей гидролиза стереоизомеров аспарагина и глутамина.

Связывание аспарагиназы из *E. coli* с нейлоновой трубкой вызывает увеличение K_m для аспарагина до $3 \cdot 10^{-3}$ М [20,21], причем сродство фермента уменьшается с увеличением скорости протекания раствора субстрата через трубку, что, по мнению авторов, вызвано ограничением транспорта субстрата в микроокружении фермента за счет диффузии.

Однако не во всех случаях ковалентное связывание аспарагиназы вызывает снижение ее сродства к аспарагину. Величина K_m аспарагина для фермента из *E. coli*, иммобилизованного на полимере Gantrez, равна $2,1 \times 10^{-5}$ М, при его связывании со стеклом или силикагелем — соответственно $2,1 \cdot 10^{-5}$ М [22], что близко к K_m нативной аспарагиназы.

Изучение скорости ферментативного гидролиза L-аспарагина, катализируемого свободной и адсорбированной на ДЭАЭ-целлюлозе аспарагиназой из *Bacterium cadaveris*, показало, что при построении графиков этой

зависимости по методу двойных обратных величин получают аномальные, нелинейные кривые. Однако при построении графика этой зависимости в координатах $1/V^2:1/S^2$ были получены прямые, позволяющие определить константу реакции, обозначенную K_m и имеющую размерность M^2 . Эта константа была одинаковой для свободного и сорбированного ферментов и имела величину порядка $1,8 \cdot 10^{-6} M^2$, что свидетельствует об отсутствии изменения сродства аспарагиназы при методе иммобилизации [23].

Сродство аспарагиназы А из *Pseudomonas fluorescens*, связанной с сефарозой 4В (K_m аспарагина равна $3,1 \cdot 10^{-4} M$), также близко к сродству этого фермента в растворе (K_m равна $4,1 \cdot 10^{-4} M$) [24].

Включение аспарагиназы из *Proteus vulgaris* в полиакриламидный гель [25], а также микрокапсулирование в нейлоновых или полиуретановых

Т а б л и ц а 2

Величина энергии активации ферментативной реакции для свободной и связанной аспарагиназы

| Источник аспарагиназы | Носитель | Метод связывания | Энергия активации, ккал/моль | | Источник литературы |
|----------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|---------------------|
| | | | свободная аспарагиназа | связанная аспарагиназа | |
| B. cadaveris | ДЭАЭ-целлюлоза | Адсорбция | 6,1 | 6,0 | [23] |
| E. coli | Полиметилметакрилат | Ковалентное связывание | 12,6 | 12,5 | [19] |
| E. carotovora | То же | То же | 9,3 | 9,3 | [19] |
| P. vulgaris | — | Микрокапсулирование | 7,44 | 7,44 | [26] |
| Ps. fluorescens (аспарагиназа А) | Сефароза 4В | Ковалентное связывание | 8,00 | 7,13 | [24] |

микрокапсулах [26, 27] приводят к увеличению K_m более чем в 100 раз — до $1,3 \cdot 10^{-3}$ — $3,3 \cdot 10^{-3} M$. С другой стороны, включение аспарагиназы из *E. coli* в поли-(2-оксиэтил)-метакрилатный гель заметно не изменяет сродства к аспарагину и величина K_m в зависимости от скорости протекания раствора субстрата через колонку с иммобилизованным ферментом составляет $2,4 \cdot 10^{-5}$ — $4,5 \cdot 10^{-5} M$ [28].

Из этих данных видно, что активность иммобилизованных аспарагиназ остается достаточно высокой для быстрого дезаминирования аспарагина. Это имеет большое значение с терапевтической точки зрения, так как аспарагиназы, K_m которых в 10 раз превышает концентрацию аспарагина в сыворотке крови человека (равную 50 мкМ), обычно не дают онкологического эффекта [29].

Влияние иммобилизации на энергию активации ферментативной реакции гидролиза аспарагина. Как видно из табл. 2, ни один из методов иммобилизации не вызывает заметного изменения энергии активации.

Влияние pH среды на активность иммобилизованной аспарагиназы. У многих ферментов иммобилизация приводит к изменению положения максимума на кривой, выражающей зависимость скорости реакции от концентрации водородных ионов в растворе. Этот эффект наблюдается и в ряде иммобилизованных аспарагиназ. Так, для аспарагиназы, ковалентно связанной со стеклом, а также с силикагелем и силохромом, оптимум действия несколько более выражен по сравнению с нативным ферментом и сдвинут в щелочную сторону [30, 31]. После присоединения фермента к дакрону оптимум действия также смещается в щелочную сторону — pH от 7,2 до 8,3 [12]. Напротив, включение аспарагиназы из *Proteus vulgaris* в полиакриламидный гель приводит к тому, что фермент обладает максимальной активностью при pH 7,0, а не при pH 8,0 [25].

Связывание аспарагиназы с полиметилметакрилатом [19], сефаразой 4В [24], коллагеном [32], нейлоном [20], микрокапсулирование [27] или ее включение в поли-(2-оксиэтил)-метакриловый гель не изменяет оптимума рН, хотя в некоторых случаях наблюдается сужение зоны, в которой фермент проявляет активность.

В большинстве случаев наблюдаемый сдвиг оптимума рН является кажущимся, так как концентрация ионов водорода в растворе и носителе различна ввиду неодинаковых скоростей диффузии кислого и щелочного продуктов ферментативной реакции или электростатического поля, создаваемого полиэлектролитной матрицей. В исследовании, проведенном Куни и соавт. [18], показано, что сдвиг оптимума рН для связанной с дакроном аспарагиназы может быть объяснен участием некоторых ионизируемых групп фермента в образовании ковалентной связи с матрицей.

Влияние иммобилизации на стабильность аспарагиназы. Практически все авторы, проводившие сравнительное изучение стабильности нативных и иммобилизованных аспарагиназ, отмечают, что иммобилизация вызывает увеличение стабильности как при 0—5°C, так и при повышенной температуре [25, 30, 31, 33—35].

Для аспарагиназы из *E. coli*, связанной с полиметилметакрилатом, время полуинактивации при 37°C возрастает с 60 до 390 ч, а для аспарагиназы из *E. carotovora* — с 70 до 308 ч [19].

Особенно резко возрастает стабильность иммобилизованной аспарагиназы к тепловой денатурации. Так, при температуре 65°C свободная аспарагиназа из *E. coli* за 10 мин инактивируется более чем на 70%, в то время как фермент, связанный с нейлоном, теряет в этих условиях не более 10% активности [20]. Десятиминутная инкубация аспарагиназы, ковалентно присоединенной к дакрону, при 50°C приводит к потере около 40% активности, а у свободного фермента такая обработка вызывает полную инактивацию [18]. Это положение можно продемонстрировать еще одним примером: ковалентное связывание аспарагиназы из *E. coli* с аминоэтилцеллюлозой не вызывает увеличения стабильности фермента при 55°C, однако стабилизирующее влияние иммобилизации четко проявляется при температуре 60 и 65°C [31].

О высокой стабильности фермента также свидетельствует способность колонок с иммобилизованной аспарагиназой в течение длительного времени (до нескольких недель) полностью гидролизовать аспарагин при непрерывном пропускании его раствора через колонку при температуре 20 или 37°C [19, 25, 33].

Стабильность по отношению к протеолитическим ферментам. Одной из причин быстрой инактивации аспарагиназы в крови является ее разрушение под действием тканевых протеаз. Иммобилизованные аспарагиназы значительно более устойчивы к их действию. При включении аспарагиназы в трехмерную структуру геля или в микрокапсулы ее контакт с макромолекулами внешней среды отсутствует, что делает эти препараты полностью нечувствительными даже к высоким концентрациям трипсина и химотрипсина [18, 26, 27].

Ковалентное связывание фермента с растворимыми или нерастворимыми матрицами также увеличивает его устойчивость к протеолиту вследствие возникающих при этом стерических препятствий. Так, водорастворимый препарат аспарагиназы, сшитый с альбумином, после трехчасовой инкубации с трипсином при комнатной температуре сохраняет 12% от исходной активности, в то время как нативный фермент в этих условиях полностью инактивируется [36]. Заметное повышение стабильности аспарагиназы к действию α -химотрипсина, трипсина и протеазы из *Streptomyces griseus* было отмечено после ее иммобилизации на стекле [30].

Таким образом, путем соответствующего подбора матриц и метода связывания возможно получение иммобилизованной аспарагиназы, которая будет высокоактивной в крови человека.

Испытание иммобилизованных аспарагиназ в биологических системах. В настоящее время намечаются два похода к использованию иммобилизованных ферментов в клинической практике. Первый из них заключается во введении препарата-фермента в организм в виде микрокапсул или мелких гранул носителя, а также в замене участков сосуда протезом, к стенкам которого присоединен фермент. Второй подход основан на использовании так называемого экстракорпорального шунта или ферментного реактора, через который циркулирует кровь больного, т.е. принципе гемодиализа.

Основными факторами, которые определяют терапевтическую ценность иммобилизованных препаратов аспарагиназы, являются их способность понижать концентрацию свободного аспарагина в крови до очень низких значений, увеличивать время, в течение которого фермент сохраняет активность, повышать прочность связывания фермента с матрицей.

Испытание препаратов иммобилизованных аспарагиназ, вводимых в организм животных. Парентеральное введение микрокапсулированной аспарагиназы было подробно исследовано Чонгом и Чангом [37] в опытах на мышах. После внутрибрюшинного введения микрокапсулированной аспарагиназы из *E. coli* в дозе 0,5 мед на 1 г массы тела свободный фермент не обнаруживается в крови в течение 16 дней, что указывает на высокую стабильность микрокапсул в организме. Время полужизни аспарагиназы после введения свободного фермента составляет 2 ч, тогда как при использовании микрокапсулированной аспарагиназы оно равно 60—72 ч и через 16 дней после введения фермента в организме еще сохраняется около 20 % от исходной активности. После инъекции свободной аспарагиназы концентрация аспарагина в плазме крови, равная у мышей приблизительно 30 нмоль/мл, через 1 ч снижается до нуля и не обнаруживается затем в течение 3 дней, на 4-й день она составляет только $3,6 \pm 2,6$ нмоль/мл и лишь к 5-му дню возвращается к исходному уровню. При использовании микрокапсулированной аспарагиназы достигается более длительное снижение концентрации аспарагина. Он не обнаруживается в плазме в течение 8 дней, но его концентрация нормализуется к 12-му дню, хотя к этому времени фермент сохраняет еще около 20 % от исходной активности. Для объяснения этого противоречия было проведено исследование микрокапсул в разные сроки после их введения в организм. Оказалось, что уже через 24 ч они становятся клейкими и начинают образовывать агрегаты. В последующем эти агрегаты увеличиваются и локализуются в области селезенки и печени. Гистологическое исследование показало, что введение микрокапсул вызывает прогрессирующую реакцию организма на чужеродное тело, которая становится ярко выраженной на 8-й день после инъекции. Вероятно, в результате этого микрокапсулы, все еще содержащие активный фермент, оказываются покрытыми непроницаемой фиброзной оболочкой, которая делает их недоступными для аспарагина.

Тем не менее однократное введение микрокапсулированной аспарагиназы в дозе 0,5 мед/г мышам с развившейся лимфосаркомой 6С3 НЕД вызывает почти полную регрессию опухоли.

Другим препаратом иммобилизованной аспарагиназы, использованной для парентерального введения, был фермент, включенный в полиакриламидный гель [38]. Внутрибрюшинное введение крысам 220 мед иммобилизованного препарата аспарагиназы в виде частичек геля с диаметром, не превышающим размер клеток, приводит к тому, что концентрация аспарагина в сыворотке крови, равная в норме 76 нмоль/мл, через 1 день составляет 1,0 нмоль/мл, через 2 дня — 1,5 нмоль/мл. Однако уже через 5 дней она возрастает до 31,5 нмоль/мл, а через 8 дней — до 59 нмоль/мл. Так же, как и для микрокапсул, частички геля, извлеченные из полости брюшины, через 9 дней после их введения сохраняют около 50 % от исходной активности и через 1 мес проявляют ферментативную активность *in vivo*. Снижение активности *in vitro*, вероятно, связано с образованием фиброзной мембраны на поверхности частичек геля. При внутривенном введении этой формы

иммобилизованной аспарагиназы не происходит выделения свободного фермента в кровь. В то же время гистологические исследования показали, что частички геля быстро проникают в ретикулоэндотелиальную систему и таким образом удаляются из кровотока. Однако при культивировании *in vitro* фибробластов человека с частичками геля не происходит включения последних в клетки и они активно дезамидируют аспарагин, добавленный к культуральной жидкости.

Аналогичные результаты в опытах *in vivo* были получены О'Дрисколлом и соавт. [28] при испытании аспарагиназы, иммобилизованной путем включения в поли-(2-оксиэтил)-метакрилатный гель.

Простейшей моделью протеза сосуда являются нейлоновые трубки с иммобилизованной на их внутренней поверхности аспарагиназой [20, 22]. При пропускании гепаринизированной крови человека со скоростью 2 мл/мин через отрезок такой трубки длиной 1 м и внутренним диаметром 1 мм концентрация аспарагина в сыворотке крови снижается с 48 до 29 нмоль/мл, а его концентрация в эритроцитах не изменяется [20]. Авторы считают, что путем увеличения длины трубки и количества связанного фермента или уменьшения скорости протекания крови можно добиться полного удаления аспарагина из сыворотки. Однако, по нашему мнению, это маловероятно, так как неполный гидролиз аспарагина, скорее всего, связан со 100-кратным снижением сродства фермента к аспарагину, вызванным модификацией фермента при иммобилизации.

Испытание аспарагиназы, связанной со стенкой дакроиового протеза сосуда, было проведено Куни и соавт. [18]. Ими было показано, что замена части общей подвздошной артерии собаки негепаринизированным протезом не вызывает заметного снижения концентрации аспарагина в плазме крови. Протез, удаленный через 3 нед после операции, был покрыт плотной фиброзной пленкой и не проявлял аспарагинозной активности *in vitro*. При вживлении сосудистого протеза, к которому, кроме аспарагиназы, был «пришит» гепарин, наблюдается резкое, почти до нуля снижение уровня аспарагина в крови. Однако оно было кратковременным, и уже на 4—5-й день после операции концентрация аспарагина составляла 50 % от исходной. В первые сутки после операции также отмечено небольшое снижение концентрации глутамина, но не обнаружено заметного изменения концентрации аммиака. Тем не менее опыты с ^{14}C -аспарагином, вводимым животным внутривенно, показали, что гидролиз аспарагина происходит даже через 10 дней после операции. Неспособность протеза поддерживать низкую концентрацию аспарагина, возможно, частично связана с компенсаторной реакцией организма, т. е. с активацией синтеза аспарагина [39].

Инъекция $1 \cdot 10^5$ клеток лейкемии 5178, чувствительных к аспарагиназе, мышам, которым предварительно внутрибрюшинно была введена суспензия дакрона, содержащая 1 мед иммобилизованной аспарагиназы, не вызывала увеличения времени выживания или уменьшения асцитного отека. Через 14 дней частички дакрона, извлеченные из организма животных, сохраняли еще 15 % от исходной активности [18].

Таким образом, эти исследования показали, что введение в организм различных форм иммобилизованной аспарагиназы не является оптимальным для клинического применения, однако оно позволяет продемонстрировать принципиальные преимущества использования этих форм фермента.

Использование ферментных аспарагиназных реакторов. Для удаления аспарагина из кровотока, кроме введения различных форм иммобилизованной аспарагиназы в организм, может быть использован так называемый экстракорпоральный шунт, т. е. ферментный аспарагиназный реактор, расположенный вне тела и соединяющий артерию и вену. При прохождении крови через такой реактор в нем происходит гидролиз аспарагина. Подобное устройство должно содержать высокоактивный фермент и обладать небольшим сопротивлением току крови, для того чтобы избежать применения насоса

Простейшим реактором подобного типа можно считать каскадный гемодиализатор, к содержимому внутренней камеры которого добавлена растворимая аспарагиназа [40, 41].

В качестве модели реактора с иммобилизованной аспарагиназой была использована циркуляционная перфузия печени крысы [22]. При перфузии через печень солевого раствора концентрация аспарагина в циркулирующей жидкости была постоянна и составляла 20 мкМ. Включение в систему нейлоновых трубок, на внутренней поверхности которых была иммобилизована аспарагиназа, позволяет снизить концентрацию аспарагина до 5—10 мкМ.

Первоначально Хиденем [42] был разработан пластинчатый реактор, имеющий небольшой размер (объем 83,5 см³) и состоящий из 10 стеклянных или полиметакрилатных пластин общей площадью 0,22 м², к которым ковалентно присоединена аспарагиназа. В дальнейшем этот реактор был усовершенствован [43, 44] так, что активность фермента в нем сохранялась по крайней мере в течение 3 мес. Включение такого реактора в систему кровообращения обезьян-бабуинов или человека уже через 1/2—2 ч приводит к практически полному удалению аспарагина из кровотока и резкому снижению иммунной реакции, оцениваемой по реактивности лимфоцитов. Хотя авторы отмечают небольшое вымывание фермента в кровь (концентрация аспарагиназы в крови в конце перфузии составляет 2·10⁻⁴ мед/мл), это, вероятно, не вызывает образования антител, так как повторные перфузии так же эффективны, как и первая [43]. В реакторе, предложенном Хиденем, через 1/2—2 ч после начала перфузии происходит коагуляция крови на пластинах. Попытка предотвратить это явление путем замены трех «аспарагиназных» пластин на «гепариновые» не увенчалась успехом [42]. Хершу и соавт. [43] удалось избежать этого осложнения за счет того, что к крови, поступающей в реактор, постоянно добавляли гепарин, который на выходе из реактора нейтрализовался протамином.

Аналогичной эффективностью обладает реактор, разработанный Ко и Хершем [45], в котором были использованы аспарагиназа, иммобилизованная на дакроновых волокнах диаметром 18 мк, и гепарин, иммобилизованный на эпоксидной смоле. Очевидными преимуществами реактора подобного типа перед пластинчатыми и трубчатыми является сравнительно высокое соотношение поверхность/объем, а также хорошее перемешивание протекающей крови, что позволяет свести до минимума лимитирующее влияние процесса диффузии на скорость ферментативной реакции.

С целью повышения биологической совместимости ферментного реактора было предложено использовать аспарагиназу, иммобилизованную на коллагене [46]. При перфузии крови собак через реактор с коллаген-аспарагиназным комплексом концентрация аспарагина в кровотоке уже через 30 мин понижается до следовых концентраций (0,5 нмоль/мл). Несомненным преимуществом этого реактора является то, что после 4 мес опытов по перфузии не происходит образования фиброзной пленки на поверхности коллаген-аспарагиназного комплекса и, таким образом, отпадает необходимость в использовании гепарина.

Все авторы отмечают хорошую переносимость перфузий с использованием ферментных аспарагиназных реакторов. Даже многократные перфузии (18 раз за 38 дней) не вызывают аллергических реакций [42]. Хотя при перфузиях наблюдается некоторое изменение количества форменных элементов крови, оно быстро нормализуется после прекращения перфузии [46].

З а к л ю ч е н и е

Таким образом, рассмотрение данных литературы о применении иммобилизованных аспарагиназ для лечения лейкозов позволяет сделать следующие выводы. При использовании иммобилизованного фермента практически полностью удается избежать образования в организме антител к аспараги-

назе. При введении в организм иммобилизованного фермента в виде микрокапсул или гранул, размер которых соответствует размеру клеток, концентрация аспарагина в крови заметно снижается. Однако это снижение недостаточно длительно из-за захвата микрокапсул и гранул ретикулоэндотелиальной системой и образования на их поверхности фиброзных отложений, препятствующих контакту фермента с субстратом. Последнее также наблюдается при использовании сосудистых протезов, ковалентно связанных с аспарагиназой. Наиболее обнадеживающие результаты получены в случае применения виетельных аспарагиназных реакторов, в которых удается избежать образования фиброзных отложений. По нашему мнению, для успешного применения ферментов в клинике необходимо при их иммобилизации использовать матрицы с высокой биологической совместимостью, в частности нерастворимые белки типа коллагена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мардашев С. Р. Биохимические проблемы медицины. М., 1975. — 2. Beard S. — *Med. Res.*, 1906, v. 69, p. 1020. — 3. Олейник И. И. — *Вопр. онкол.*, 1966, № 11, с. 104. — 4. Березов Т. Т. — *Вестн. АМН СССР*, 1971, № 11, с. 35—46. — 5. Schwartz M. K. — *Clin. Chem.*, 1973, v. 19, p. 10—12. — 6. Cooney D. A., Rosenbluth R. I. — *Advanc. Pharmacol. Chemother.*, 1975, v. 12, p. 185—283. — 7. Химиотерапия злокачественных опухолей. Под ред. Н. Н. Блохина. М., 1977. — 8. Sobin L. H., Kidd J. C. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1965, v. 119, p. 325—327. — 9. Carpinzi R. L., Bertino J. R., Skeel R. T. et al. — *Ann. intern. Med.*, 1971, v. 74, p. 893—901. — 10. Burgchenal J. H., Karnofsky D. C. — *Cancer (Philad.)*, 1970, v. 25, p. 241—243. — 11. Broom J. D. — *J. exp. Med.*, 1968, v. 127, p. 1055—1058. — 12. Николаев А. Я. — *Пробл. гематол.*, 1969, № 7, с. 51—60. — 13. Роль аспарагиназы в энзимотерапии опухолей. Под ред. Т. Т. Березова. М., 1972. — 14. *Clinical Cancer chemotherapy*. Ed. E. M. Greenspan. New York, 1975, p. 61—69. — 15. Hasselberger F. X., Allen B., Paruchuri E. K. et al. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 57, p. 1054—1062. — 16. Jaffe W., Traggis D., Dan L. et al. — *Cancer Res.*, 1971, v. 31, p. 942—949. — 17. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы. Под ред. И. В. Березина. М., 1976. — 18. Cooney D., Weetall H., Long E. — *Biochem. Pharmacol.*, 1975, v. 24, p. 503—515. — 19. Herish L. S. — *J. polymer Sci.*, 1974, v. 47, p. 55—67. — 20. Allison J. P., Davidson L., Gutierrez-Hartman A. et al. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 47, p. 66—73. — 21. Mondy W., Allison J., Kitto J. — *Fed. Proc.*, 1972, v. 31, p. 496. — 22. Horvath C., Szadi A., Woods J. S. — *J. appl. Physiol.*, 1973, v. 34, p. 181—187. — 23. Николаев А. Я. — *Биохимия*, 1962, т. 27, с. 843—848. — 24. Козлов Е. А., Петрий О. П. — В кн.: Сборник научных работ мед. факультета Ун-та дружбы народов им. Патриса Лумумбы по проблеме злокачественного роста. М., 1977, с. 55. — 25. Mori T., Tosa T., Chibata I. — *Cancer Res.*, 1974, v. 34, p. 3066—3068. — 26. Mori T., Sato T., Matuo Y. et al. — *Biotechnol. Bioeng.*, 1972, v. 14, p. 663—673. — 27. Mori T., Tosa T., Chibata I. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 321, p. 653—661. — 28. O'Driscoll K. F., Korus R. A., Ohnuma T. et al. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1975, v. 195, p. 382—388. — 29. Wristin J. C., Yellin T. — *Advanc. Enzymol.*, 1973, v. 39, p. 185—248. — 30. Yaqub M., Glire P. — *J. Biomed. Mat. Res.*, 1974, v. 8, p. 291—297. — 31. Карсакевич А. С., Мигла Г. Я., Жагат Р. А. — *Прикладная биохим.*, 1975, № 11, с. 773—776. — 32. Venkatasubramanian K., Vieth W. R., Bernath F. R. — *Enzyme Eng.*, 1974, v. 2, p. 439—445. — 33. Николаев А. Я., Мардашев С. Р. — *Биохимия*, 1961, т. 26, с. 641—645. — 34. Hasselberger F. X., Brown H. D., Chatteradhyay S. K. et al. — *Cancer Res.*, 1970, v. 3, p. 2736—2738. — 35. O'Driscoll K. F. — *Med. Wld News*, 1972, v. 13, p. 74—78. — 36. Paillet B., Remy M. H., Thomas D. et al. — *Path. et Biol.*, 1974, v. 22, p. 491—495. — 37. Chong E. S. S., Chang T. M. S. — *Enzyme*, 1974, v. 18, p. 218—239. — 38. Nadler H. L., Updike S. J. — *Enzyme*, 1974, v. 18, p. 150—160. — 39. Woods J. S., Handschumacher R. E. — *Am. J. Physiol.*, 1973, v. 224, p. 740—745. — 40. Galetti P. — *Patent U. S. A.*, 1971, 3, 619, 423. — 41. Miller D. S., Laszlo I., Lyon M. — *Cancer (Philad.)*, 1972, v. 29, p. 1347—1351. — 42. Hyden H. — *Arzneimittel-Forsch.*, 1971, Bd 21, S. 1671—1675. — 43. Sampson D., Han T., Herish L. S. et al. — *J. surg. Oncol.*, 1974, v. 6, p. 39—48. — 44. Sampson D., Han T., Herish L. S. — *In: Medical Primatology*. Basel, 1972, p. 134—141. — 45. Ko R. J. C., Herish L. S. — *J. Biomed. Mat. Res.*, 1976, v. 10, p. 249—258. — 46. Olanoff L. S., Ber-

nath F. R., Venkatasubramanian K. — Am. chem. Soc. Polymer. Prepr., 1975, v. 16, p. 203—208. — 47. Sampson D., Herish L. S., Cooney D. A. et al. — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1972, v. 18, p. 54—58. — 48. Herish L. S. — Enzyme. Eng., 1974, v. 2, p. 425—432. — 49. Weetall H. — J. Biomed. Mat. Res., 1970, v. 4, p. 597—599. — 50. Inada I., Shige-hisa H., Masahisa O. et al. — Enzyme, 1975, v. 20, p. 188—192. — 51. Olano L. S. — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1975, v. 21, p. 156—164. — 52. Guibault G. G., Hrabanova E. — Anal. chim. Acta, 1971, v. 56, p. 285—290. — 53. Horvath C. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 358, p. 164—177. — 54. Updike S., Wakamiya R., Lighfoot E. — Science, 1976, v. 193, p. 681—683. — 55. Fishman J., Citri N. — FEBS Letters, 1975, v. 60, p. 17—20. — 56. Chang T. — Nature, 1971, v. 229, p. 117—118. — 57. Chang T. M. S. — Enzyme, 1972/1973, v. 14, p. 95—104. — 58. Chang T. M. S. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1971, v. 44, p. 1531—1536. — 59. Chang T. M. S. — Proc. Canad. Fed. Biol. Sci., 1969, v. 12, p. 62. — 60. Chang T. M. S. — In: International Congress of Pharmacology. 6th. New York, 1976, v. 5, p. 262.

Поступила 26/VI 1977 г.

УДК 615.31:546.173].015.46

Р.-Д. Д. Бодиев, Т. Ф. Чиркина

ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОТИВОТКАНЕВЫХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ НИТРИТОВ

Кафедра биохимии и микробиологии Восточно-Сибирского технологического института, Улан-Удэ

Выявлено образование гуморальных циркулирующих комплементсвязывающих антител к тканевым антигенам подопытных крыс, получавших в течение 300 дней нитрит натрия per os в дозе 6,67 мг на 1 кг живой массы. Установлена специфичность антител с помощью антисыворотки к тест-антигену — нитробелку.

Существует немало работ, отражающих разные аспекты влияния нитритов пищи на организм животных и человека [1—5]. Однако взаимодействие нитритов с тканевыми белками до сих пор не изучалось. Исследование этого вопроса представляет большой интерес в связи с тем, что некоторые химические вещества могут вступать во взаимодействие с белками и действовать как активные гаптены в иммунологических реакциях *in vivo* и *in vitro*. Под действием этих веществ могут происходить нарушения антигенной структуры тканей задолго до морфологического проявления [6, 7]. При наличии нарушений антигенной структуры тканей возникают иммунологические реакции со стороны организма [8, 9].

В связи с этим мы изучали возможность взаимодействия нитрита натрия с тканевыми белками при его длительном пероральном поступлении в организм лабораторных животных и образования при этом гуморальных противотканевых антител.

Методика

Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах разведки Рапполовского питомника с первоначальной средней массой 100—120 г. Животных разделили на 2 группы, одна из которых получала ежедневно в течение 300 дней водный раствор нитрита натрия в дозе 6,67 мг на 1 кг живой массы, а вторая служила контролем. Подопытных и контрольных крыс содержали в одинаковых условиях. В первые 6 мес от начала эксперимента крыс забивали декапитацией ежемесячно, последующие забои делали через 8, 10 и 12 мес. Забой крыс через 12 мес от начала эксперимента преследовал цель установления остаточных влияний препарата после прекращения его поступления.

Водно-солевые экстракты из гомогенатов тканей печени, почек, легких, селезенки, сердца, желудка использовали как возможные аномальные антигены в иммунологических реакциях.

В сыворотке крови подопытных и контрольных крыс определяли антитела к указанным тканевым антигенам в классической реакции связывания комплемента (РСК). Антикомплементарную активность исследуемых сывороток понижали прогреванием на водяной бане при 56°C в течение 30 мин.

Для установления специфичности предполагаемых антител был синтезирован конъюгат — нитробелок. При синтезе за основу был взят метод Ландштейнера [10]. Иммунизацию производили попеременным введением нитробелка внутривенно и внутрибрюшинно кроликам породы шиншилла. Полученная иммунная сыворотка была абсорбирована исходным белком, взятым для конъюгации, и тканевыми антигенами контрольных крыс. Источенную иммунную сыворотку испытывали в реакции преципитации в агаровом геле по Оухтерлони в модификации Гусева и Цветкова [11].

Были поставлены необходимые контрольные опыты: перекрестные реакции в РСК между сыворотками контрольных крыс с тканевыми антигенами подопытных крыс и наоборот. Результаты РСК обработаны статистически с определением критерия Фишера — Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При постановке классической РСК с сыворотками и тканевыми антигенами интактных крыс в аутологичной системе нами лишь в единичных случаях отмечены положительные результаты в разведениях сывороток 1:10 и 1:20.

Таблица 1

Частота обнаружения противотканевых антител и их титры в сыворотках крыс, длительно получавших нитрит натрия в дозе 6,67 мг на 1 кг массы (количество крыс в каждом опыте 18—20)

| Срок исследования, дни | Антиген | Количество сывороток, давших положительную РСК | | | | | | | Средний титр | P |
|------------------------|---------|--|-----------------|--------------|------|------|-------|-------|--------------|-------|
| | | всего | % положительных | титр антител | | | | | | |
| | | | | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | | |
| 30 | Печени | 14 | 70 | 14 | | | | | 14,0±3,0 | <0,05 |
| | Почек | 14 | 70 | 14 | | | | | 14,0±3,0 | |
| | Легких | 8 | 40 | 6 | 2 | | | | 10,0±4,4 | |
| 60 | Печени | 6 | 30 | 6 | | | | | 6,0±3,0 | <0,05 |
| | Почек | 20 | 100 | 4 | 14 | 2 | | | 40,0±5,1 | |
| | Легких | 16 | 80 | 14 | 2 | | | | 18,0±3,5 | |
| 90 | Печени | 20 | 100 | 2 | 16 | | | | 42,0±4,6 | <0,05 |
| | Почек | 20 | 100 | | | 2 | 12 | 6 | 200,0±27,3 | |
| | Легких | 20 | 100 | | 8 | 8 | 4 | | 80,0±14,6 | |
| 120 | Печени | 14 | 70 | 6 | 8 | | | | 28,0±5,5 | <0,05 |
| | Почек | 20 | 100 | 12 | 8 | | | | 28,0±3,2 | |
| | Легких | 18 | 90 | 8 | 10 | | | | 28,0±4,4 | |
| 150 | Печени | 6 | 30 | 6 | | | | | 6,0±3,0 | <0,05 |
| | Почек | 16 | 80 | 4 | 10 | 2 | | | 32,0±7,4 | |
| | Легких | 12 | 60 | 4 | 6 | 2 | | | 24,0±8,3 | |
| 180 | Печени | 2 | 11 | 2 | | | | | 2,2±2,2 | <0,05 |
| | Почек | 8 | 44 | 2 | | | 6 | | 55,5±2,6 | |
| | Легких | 10 | 55 | 8 | | 2 | | | 17,7±8,4 | |
| 240 | Печени | 6 | 30 | 6 | | | | | 6,0±3,0 | <0,05 |
| | Почек | 8 | 44 | 8 | | | | | 5,5±2,4 | |
| | Легких | 6 | 30 | 4 | | 2 | | | 12,0±8,0 | |
| 300 | Печени | 2 | 10 | 2 | | | | | 2,0±2,0 | <0,05 |
| | Почек | 6 | 30 | 6 | | | | | 6,0±3,0 | |
| | Легких | 4 | 20 | 4 | | | | | 4,0±2,6 | |
| 360 | Печени | | | | | | | | | <0,05 |
| | Почек | 2 | 10 | | 2 | | | | 4,0±4,0 | |
| | Легких | — | | | | | | | | |

При исследовании сывороток подопытных крыс обнаружено, что введение нитрита вызывает иммунологический ответ организма уже в первый срок исследования, т. е. через 30 введений препарата (табл. 1 и 2).

Аутосыворотки крыс реагировали с тканевыми антигенами всех исследуемых органов. Частота реагирующих сывороток в РСК колебалась от 30 до 70 %.

Через 60 дней введения нитрита натрия определялись антитела к антигенам собственных органов в титрах 1:20 и 1:40, но частота реагирующих сывороток была повышена. В более поздние сроки, после 90 дней затравки,

наблюдали наибольший иммунологический ответ организма, который выражался в максимальном количестве реагирующих сывороток и в присутствии наибольшего количества антител. В этот период средние титры противотканевых антител были достоверно самыми высокими по сравнению с предыдущими и последующими месяцами эксперимента. Больше всего антител образовывалось к антигенам почек (1:200), легких (1:80) и селезенки (1:52).

Т а б л и ц а 2

Частота обнаружения противотканевых антител и их титры в сыворотках крови крыс, длительно получавших нитрит натрия в дозе 6,67 мг на 1 кг массы (количество крыс в каждом опыте 18—20)

| Срок исследования, дни | Антигены тканей | Количество сывороток, давших положительную РСК | | | | | | Средний титр | P |
|------------------------|-----------------|--|---------------|--------------|------|------|-------|--------------|-------|
| | | всего | % реагирующих | титр антител | | | | | |
| | | | | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | | |
| 30 | Селезенки | 6 | 30 | 4 | 2 | | | 8,0±4,4 | <0,05 |
| | Сердца | 8 | 40 | 8 | | | | 8,0±3,2 | |
| | Желудка | 12 | 60 | 6 | 6 | | | 18,0±5,5 | |
| 60 | Селезенки | 18 | 100 | 6 | 12 | | | 33,3±3,3 | |
| | Сердца | 18 | 90 | 14 | 4 | | | 22,0±3,5 | |
| | Желудка | 16 | 80 | 6 | 10 | | | 26,0±5,2 | |
| 90 | Селезенки | 20 | 100 | | 14 | 6 | | 52,0±6,1 | |
| | Сердца | 20 | 100 | 2 | 18 | | | 38,0±2,0 | |
| | Желудка | 20 | 100 | | 14 | 6 | | 52,0±6,1 | |
| 120 | Селезенки | 16 | 80 | 8 | 8 | | | 24,0±4,9 | |
| | Сердца | 10 | 50 | 10 | | | | 10,0±3,3 | |
| | Желудка | 20 | 100 | 10 | 10 | | | 30,0±3,3 | |
| 150 | Селезенки | 12 | 60 | | 8 | 4 | | 32,0±9,9 | |
| | Сердца | 12 | 60 | 10 | 2 | | | 13,0±4,2 | |
| | Желудка | 14 | 70 | 12 | 2 | | | 16,0±4,0 | |
| 180 | Селезенки | 8 | 44 | 4 | 2 | 2 | | 17,7±9,0 | |
| | Сердца | 2 | 12 | 2 | | | | 2,5±2,5 | |
| | Желудка | 8 | 44 | 4 | 4 | | | 13,3±5,7 | |
| 240 | Селезенки | 6 | 30 | 2 | 4 | | | 10,0±5,3 | |
| | Сердца | 2 | 10 | 2 | | | | 2,0±2,0 | |
| | Желудка | 8 | 40 | 6 | 2 | | | 10,0±4,4 | |
| 300 | Селезенки | 10 | 50 | | 10 | | | 20,0±6,6 | |
| | Сердца | 2 | 10 | 2 | | | | 2,0±2,0 | |
| | Желудка | 8 | 40 | 6 | 2 | | | 10,0±4,4 | |
| 360 | Селезенки | 0 | | | | | | | |
| | Сердца | 0 | | | | | | | |
| | Желудка | 0 | | | | | | | |

В дальнейшем было отмечено как достоверное снижение средних титров антител, так и уменьшение количества реагирующих в РСК сывороток.

После 180-дневного введения нитритов установлено снижение иммунологического ответа организма и противотканевые антитела определялись в основном в титрах 1:20.

Через 2 мес после прекращения введения препарата комплементсвязывающие антитела к тканевым антигенам крыс не выявлены.

При постановке перекрестных реакций между сыворотками контрольных крыс с тканевыми антигенами подопытных животных получены положительные результаты в разведениях сывороток 1:10 и 1:20, что принималось нами за неспецифическую реакцию при интерпретации результатов РСК. При исследовании сывороток подопытных крыс и тканевых антигенов «нормальных» животных были получены аналогичные результаты.

Антисыворотки, полученные иммунизацией кроликов синтезированным антигеном, были испытаны в реакции преципитации. Затем иммунные сыворотки были истощены исходным белком, взятым для конъюгации, и

тканевыми антигенами контрольных крыс. Убедившись, что иммунные сыворотки не реагируют с исходным белком и антигенами интактных крыс, их исследовали в реакции преципитации с тканевыми антигенами подопытных крыс, получавших нитрит натрия. При исследовании кроличьих антисывороток к синтезированному антигену, содержащему химическую группировку — NO₂, с тканевыми антигенами всех исследуемых органов получены изолированные полосы преципитации.

Полученные результаты позволили сделать вывод об образовании гуморальных специфических антител при длительном поступлении в организм крыс нитритов. Явления аутоиммунизации организма в ответ на введение нитритов позволяют предположить, что в исследуемых тканях определенные группы белков видоизменяются, становясь антигенными. Эти изменения связаны, по-видимому, с образованием комплексов в результате нитрозирования белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попов В. И. — Науч. труды Центр. ин-та усовершенствования врачей, 1969, т. 135, с. 36—41. — 2. Preda N. — *Igiene* (Бус.), 1970, v. 19, p. 559—563. — 3. Сымон К., Кнотек З., Шмидт П. и др. — *Гиг. и сан.*, 1963, № 10, с. 7—13. — 4. Sachse R. — *Z. ges. Hyg.*, 1966, Bd 12, S. 243—247. — 5. Субботин Ф. Н., Волкова Н. В. — В кн.: Республиканский съезд эпидемиологов, микробиологов, инфекционистов и гигиенистов. 2-й. Сборник докладов. Таллин, 1972, с. 309—311. — 6. Коростелева Т. А. Об изменениях тканевых антигенов в процессе экспериментального канцерогенеза. Л., 1966, с. 53—98. — 7. Landsteiner K. *The Specificity of Serological Reactions*. Cambridge, 1946, p. 42—50. — 8. Адамов Л. К., Николаев Н. И. Молекулярные механизмы антигенного действия веществ. Саратов, 1967. — 9. Здродовский П. Ф. — *Тер. арх.*, 1960, № 11, с. 3—9. — 10. Landsteiner K., Prasek E. — *Z. Immun.-Forsch.*, 1913, Bd 20, S. 211—237. — 11. Гусев А. И., Цветков В. С. — *Лаб. дело*, 1961, № 2, с. 43.

Поступила 30/IX 1977 г.

DETECTION OF ANTITISSUE ANTIBODIES IN RAT BLOOD SERUM IN ADMINISTRATION OF NITRITES

R. D. Bodiev, T. F. Chirkina

Chair of Biochemistry and Microbiology, East-Siberian Institute of Technology, Ulan-Ude

Formation of humoral specific complement-binding antibodies to tissue antigens was found in rats, treated per os with sodium nitrite at a dose 6.67 mg/kg of body weight within 300 days.

УДК 615.217.32+615.218.1+615.355].015.43:612.128

В. А. Проценко, И. В. Богадельников, И. Ф. Спицын

АНТИПРОТЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ, ГИСТАМИНА И АЦЕТИЛХОЛИНА

Кафедра патологической физиологии и кафедра детских инфекций Крымского медицинского института, Симферополь

В эксперименте на кроликах изучено состояние триптической и антиферментной емкости при парентеральном введении трипсина, химотрипсина, гистамина, ацетилхолина и калликреина. Применение химотрипсина приводит к наиболее благоприятным изменениям по сравнению с трипсином и калликреином. Установлено увеличение триптической и снижение антиферментной активности сыворотки крови при введении гистамина и ацетилхолина.

В настоящее время при лечении многих заболеваний применяется парентеральное введение биологически активных веществ.

В какой мере их введение изменяет антитриптическую активность, характеризующую содержание α_1 -антитрипсина и способность сыворотки

крови связывать ферменты протеолиза, еще не нашло достаточного отражения в литературе и требует обсуждения.

М е т о д и к а

Исследование проводили на 27 кроликах массой 2,9—3,5 кг. Коммерческие препараты биологически активных веществ вводили внутривенно в физиологическом растворе в объеме 3 мл в течение 3 мин в следующих дозировках: трипсин и химотрипсин производства Ленинградского мясокомбината из расчета 0,5 мл на 1 кг массы кролика, гистамин — 0,05 мг/кг и ацетилхолин — 1,5 мг/кг, калликреин фирмы «Winthrop» — 0,5 мг/кг. Кровь для исследования брали до введения препаратов, а также через 30 мин, 1, 3, 6 и 24 ч после введения биологически активных веществ. Триптическую и антитриптическую активность сыворотки крови изучали ранее описанным методом в модификации В. А. Шатерникова [1], используя в качестве субстрата N-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилид (БАПНА).

Для оценки способности сыворотки крови связывать трипсин, химотрипсин и калликреин использовали метод В. В. Карпицкого [2]. Количество ферментов, связанных сывороткой крови, определяли при помощи метода радиальной иммунодиффузии [3].

Приготовление смеси иммунной сыворотки с раствором агара. Антитриптическую сыворотку смешивали на водяной бане с 1,5% раствором агара, приготовленным на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,3 в соотношении 1:5, и разливали на стекла с толщиной пленки агара 1,5 мм. После уплотнения в агаре пробивали лунки диаметром 2 мм на расстоянии 1,5 см друг от друга.

Построение калибровочной кривой. Растворы трипсина в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,3 в концентрации 12,5; 25, 50, 100 мкг/мл и т. д. с интервалом 50 мкг до концентрации 1000 мкг/мл вносили в лунки в объеме 0,004 мл. Через 24 ч измеряли диаметр образовавшихся колец преципитации. По полученным данным строили калибровочную кривую, где на оси абсцисс было показано количество трипсина (в микрограммах), на оси ординат — квадрат диаметра кольца преципитата (в миллиметрах).

Опытным путем было установлено, что 0,5 мл цельной сыворотки крови животных и людей связывают от 70 до 100 мкг трипсина, который после инкубации с сывороткой не может быть преципитирован. Внесение в 0,5 мл сыворотки 200 мкг трипсина позволяет проводить последующие исследования с характеристикой ингибированного трипсина по калибровочной кривой.

Постановка опыта. 0,5 мл исследуемой сыворотки смешивали с 200 мкг трипсина в 0,5 мл буфера и инкубировали на водяной бане ультратермостата при 37°C в течение 30 мин, после чего вносили 0,004 мл в три параллельные лунки. Через 24 ч измеряли диаметр колец преципитации и по калибровочной кривой находили количество трипсина, оставшееся после инкубации с исследуемой сывороткой. Калибровочная кривая является контролем опыта и строится в каждой серии опытов.

Аналогичным путем изучали способность сыворотки крови связывать химотрипсин — антихимотриптическую емкость и калликреинантикаликреиновую емкость.

Антисыворотки получали путем внутрикожно-инъективной иммунизации кроликов [4]. В опыт брали сыворотки, имеющие следующие характеристики: зона эквивалентности 200 мкг/мл с содержанием антител около 400 мкг/мл. Чувствительность сывороток по разведению антигена составляла 1:320 000.

Способность сыворотки крови связывать фермент и выключать его из иммунохимической реакции характеризовалась нами как антиферментная емкость. Полученные результаты обработаны разностным методом вариационной статистики [5].

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

Внутривенное введение биологически активных веществ вызывало закономерное повышение триптической активности сыворотки крови, которая и через 24 ч оставалась выше исходного уровня (см. таблицу).

Если увеличение БАПНА-расщепляющей активности сыворотки крови при введении трипсина можно объяснить его непосредственным действием на данный субстрат, то достоверное увеличение, особенно через 30 мин после введения других изучаемых нами веществ, особенно гистамина и ацетилхолина, следует рассматривать как результат активации трипсиноподобных ферментов системы крови.

За исключением гистамина, во всех наблюдаемых случаях отмечалось снижение антитриптической активности, что указывает на снижение в сыворотке крови уровня естественных ингибиторов трипсина. При введении гистамина отмечались резкие колебания антитриптической активности с общей тенденцией к увеличению.

При изучении антитриптической емкости было отмечено, что введение трипсина значительно снижает ее в течение 1 ч наблюдений. Уровень ее

Триптическая и антитриптическая активность сыворотки крови до и после парентерального введения биологически активных веществ

| | Препарат | До введения препарата | Время после введения препарата | | | |
|--------------------------------------|---|-----------------------|--|--|---|--|
| | | | 30 мин | 1 ч | 3 ч | 24 ч |
| Триптическая активность, МЕд | Трипсин Химотрипсин Калликреин Гистамин Ацетилхолин | 1,18±0,15 | +3,88±0,64* +0,46±0,27 +2,06±0,71* +0,91±0,26* +0,56±0,10* | +3,72±0,28* +0,56±0,23 +2,20±0,55* +0,70±0,36 +0,66±0,30 | +1,03±0,37 +1,20±1,00 +1,10±0,60 +0,10±0,38 +0,50±1,10 | -0,20±0,30 +1,06±0,38 +0,25±0,25 +0,58±0,54 +0,80±0,76 |
| Антитриптическая активность, МЕд | Трипсин Химотрипсин Калликреин Гистамин Ацетилхолин | 252±6,6 | -4,9±10,1 -15,8±16,7 -19,4±8,1 +23,4±27,3 -31,5±5,3* | -12,9±13,8 -40,5±12,3* -43,2±6,1* +50,2±21,6 -30,0±12,5 | -0,80±3,70 -19,6±26,6 -28,4±22,0 +50,1±14,7* -52,0±25,7 | -23,3±25,1 -19,6±29,6 -29,6±11,1 +32,0±19,4 +2,0±32,7 |
| Антитриптическая емкость, мкг/мл | Трипсин Химотрипсин Калликреин Гистамин Ацетилхолин | 248±6,7 | -16,3±4,7* +25,3±3,0* +3,0±6,8 -15,5±4,2* -24,1±5,6* | -24,0±6,7* +24,6±10,1 +13,0±3,6* -22,5±4,8* -17,0±4,7* | -4,0±2,10 +20,3±18,3 +6,0±10,0 -17,0±3,6* -13,5±7,9 | -4,8±3,2 +4,3±30,0 -11,0±6,7 -5,7±2,3 -5,0±2,2 |
| Антихимотриптическая емкость, мкг/мл | Трипсин Химотрипсин Калликреин Гистамин Ацетилхолин | 144±7,6 | -42,6±2,0* +51,0±9,1* -8,4±4,7 -15,0±1,7* -24,3±6,0* | -43,3±20,0 +45,5±8,4* -18,6±5,7* -24,5±1,4* -14,8±7,9 | -35,3±12,6 +39,8±4,8* -9,0±10,7 -15,5±2,9* -4,5±4,9 | -14,6±4,6* +19,0±9,5 -7,6±14,0 -11,1±3,8 -6,5±5,9 |
| Антикалликреиновая емкость, мкг/мл | Трипсин Химотрипсин Калликреин Гистамин Ацетилхолин | 198±15,1 | +67,6±17,0* +25,3±7,3* +20,0±4,4* -9,5±2,5* -23,1±4,0* | +57,0±4,9* +37,3±8,9* +25,0±2,4* -21,7±3,1* -53,8±5,9* | +16,3±19,6 +8,6±5,1 +22,4±9,2 -26,5±5,6* -52,5±6,7* | -5,0±23,3 -17,3±5,8 -2,0±7,4 -12,7±7,7 -11,0±3,0* |

* $P < 0,05$.

снижения соответствует количеству введенного трипсина, что отмечалось нами ранее [3]. Введение химоотрипсина не дает сколько-нибудь значительного изменения БАПНА-расщепляющей активности сыворотки крови, что согласуется с данными литературы [6]. Выраженные индивидуальные колебания в изменении антитриптической активности с тенденцией к снижению сопровождаются повышением способности сыворотки крови связывать химоотрипсин, трипсин и калликреин. Эти явления могут быть объяснены изменениями активности в сложной системе ингибиторов сыворотки крови под влиянием химоотрипсина. Косвенно на это указывает значительная активация ингибирующего влияния специфического глобулина крови на воспаление при парентеральном введении химоотрипсина [7]. Введение калликреина дает резкое увеличение емкости сыворотки крови по отношению гомологичного фермента и разнонаправленные результаты в изменении емкости по отношению к трипсину и химоотрипсину. Такой характер изменений антитриптической и антихимоотриптической емкости при введении калликреина можно объяснить тем фактом, что компоненты ингибиторов калликреина одновременно являются и ингибиторами трипсина и химоотрипсина [8—10]. Однако эти ингибиторы имеют разную скорость взаимодействия с ферментами и различия в индивидуальном сродстве с ними [11, 12]. Особый интерес в данных наблюдениях представляет значительное снижение антитриптической емкости при введении гистамина и ацетилхолина. Эти показатели можно рассматривать как связывание ингибиторов системы протеолиза протеолитическими ферментами, образовавшимися в крови под действием гистамина и ацетилхолина [13—15]. При введении этих препаратов значительно снижается способность сыворотки крови связывать химоотрипсин и калликреин. Эти данные указывают на уменьшение содержания в системе ингибиторов сыворотки крови α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина, которые являются основными ингибиторами, связывающими трипсин, химоотрипсин и калликреин [8—10].

Увеличение триптической активности и значительное снижение антиферментной емкости сыворотки крови по отношению к трипсину, химоотрипсину и калликреину при введении гистамина и ацетилхолина указывают на то, что эти вещества являются пусковыми факторами в активации системы протеолиза, а снижение антиферментной емкости создает условия для активации и действия калликреин-кининовой системы. Только этим можно объяснить длительность эффектов этих веществ при парентеральном введении, так как сами они быстро разрушаются в организме. Такой характер их действия необходимо учитывать и при патогенетической терапии состояний, сопровождающихся значительным увеличением гистамина и ацетилхолина в организме. Поэтому усиление системы ингибиторов протеолиза следует считать необходимым условием в патогенетической терапии этих состояний.

Из наших данных следует, что наиболее благоприятный эффект отмечается при парентеральном введении химоотрипсина, так как при этом наблюдается относительно минимальное увеличение триптической активности и значительное увеличение способности сыворотки крови связывать не только химоотрипсин, но также и трипсин и калликреин.

При использовании биологически активных веществ необходимо знать состояние антиферментной емкости сыворотки крови, что может определить выбор фермента при проведении лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шатерников В. А. — *Вопр. мед. химии*, 1966, № 1, с. 103—106.
2. Карницкий В. В. Способ определения активности антитрипсина в сыворотке крови. Авт. свид. СССР № 47434, 1975.
3. Проценко В. А., Богадельников И. В., Кривошеин Ю. С. и др. — *Укр. биохим. ж.*, 1977, № 2, с. 113—116.
4. Проценко В. А., Спицын И. Ф., Карпицкий В. В. — *Лаб. дело*, 1972, № 7, с. 438.
5. Ойвин И. А. — *Пат. физиол.*, 1960, № 4,

с. 67. — 6. Goeven W. A., Baldwin M. M. — *Gerontologia*, 1971, v. 17, p. 203—218. — 7. G a b r e r, Fosdick, 1965. Цит. Веремеенко К. Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев, 1971. — 8. В е р е м е е н к о К. Н. Киновая система. Киев, 1977. — 9. Д з и з и н с к и й А. А., Г о м а з к о в О. А. Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Новосибирск, 1976. — 10. M e S o n n e l l D. J. — *J. clin. Invest.*, 1972, v. 51, с. 1611. — 11. Х о д о р о в а Е. Л., В е р е м е е н к о К. Н., Б е л и ц е р В. А. — *Вопр. мед. химии*, 1969, № 1, с. 10. — 12. S z c z e k l i k E., S z e w c z u k A. — *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 1972, v. 26, p. 731. — 13. Д ы м ш и ц Е. Л. — *Сб. науч. трудов Андижанск. мед. ин-та*, 1971, т. 5, с. 148—150. — 14. У и л х е л м Д. Л. — *Пат. физиол.*, 1968, № 3, с. 3. — 15. W e s t G. B. — *J. Pharm. Pharmacol. Lond.*, 1962, v. 14, p. 618—619.

Поступила 1/IX 1977 г.

THE ANTIPROTEASE ACTIVITY OF BLOOD SERUM IN PARENTERAL ADMINISTRATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES, HISTAMINE AND ACETYLCHOLINE

V. A. Protsenko, I. V. Bogadel'nikov, I. F. Spitsin

Chairs of Pathophysiology and of Child Infections, Krimean Medical School, Simpheropol

State of tryptic and the antienzymatic activities of rabbit blood serum was studied after parenteral administration of trypsin, chymotrypsin, histamine, acetylcholine and kallikrein. Treatment with chymotrypsin led to the most favorable alterations in animals as compared with trypsin and kallikrein effects. Activity of trypsin was increased and the antienzymatic activity was decreased in blood serum after administration of histamine and acetylcholine. This suggests that antiprotease drugs may be used in therapy of diseases, accompanied by increase in content of histamine and acetylcholine.

УДК 616.36-002-092.9-07:616.36-018.11

К. Т. Алматов, М. М. Рахимов

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГЕПАТИТЕ

Лаборатория экспериментальной гастроэнтерологии Научно-исследовательского института краевой медицины Министерства здравоохранения Узбекской ССР, Ташкент

При экспериментальном гепатите у крыс, вызванном введением CCl_4 , изменяются параметры окислительного фосфорилирования, скорость дыхания при различных метаболических состояниях, а также активность и стабильность полиферментных систем митохондрий печени. Белки и фосфолипиды мембран митохондрий при гепатите более подвержены действию трипсина и фосфолипазы D. Кинетика десорбции цитохрома с из мембран митохондрий свидетельствует, что при гепатите изменяется способность мембран к удержанию экзогенных белков.

В последнее время усилился интерес исследователей к изучению структуры митохондрий и их функционирования при различных патологических процессах [1—4]. Одним из важных наблюдений является снижение стабильности различных полиферментных систем митохондрий, выделенных из органов животных с патологическими изменениями, к действию нагревания, литических ферментов и других внешних факторов. Так, например, показано, что при хроническом колите снижается устойчивость НАД·Н-оксидазы, сукцинатоксидазы и цитохром с-оксидазы митохондрий печени и поджелудочной железы к тепловому воздействию [5, 6]. Значительные изменения в стабильности полиферментных систем дыхательной цепи и системе окислительного фосфорилирования наблюдаются и у митохондрий печени крыс, подвергавшихся тепловому воздействию [7], а также при старении животных [8]. Величина таких изменений (например, изменение константы инактивации) более четко характеризует состояние митохондрий при патологии, чем изменения скорости дыхания и параметров окислительного фосфорилирования, обычно проводимые исследователями. Последние при определенных патологических процессах могут существенно не изменяться [6].

Представляло интерес показать, что изменения стабильности митохондрий проявляются не только при указанных выше видах патологии, но и имеют общий характер и не зависят от вида патологического процесса. Это особенно важно в связи с тем, что снижение стабильности свидетельствует об образовании «скрытых повреждений» в структуре мембран митохондрий [7], которые, в частности, заключаются в нарушении фосфолипид-белковых взаимодействий в мембранах. Исходя из этого, мы исследовали состояние митохондрий печени при гепатите, вызываемом введением CCl_4 . Выбор этой модели был обусловлен тем, что при действии CCl_4 печень подвергается глубоким структурным изменениям [9—12]; изменяется активность различных ферментов и полиферментных систем, включая ферментативные процессы, протекающие в митохондриях [13—17]. Ниже приведены результаты изучения деградации митохондрий, выделенных из печени крыс с гепатитом при различных видах внешних воздействий (нагревание, действие трипсина, фосфолипазы D и некоторых субстратов).

Методика

Токсическое поражение печени (гепатит) вызывали введением CCl_4 в дозе 0,12 мл на 100 г массы животного подкожно (в бедро) через день в течение 25 дней. Исследования проводили на крысах-самцах массой 200—220 г. Животных забивали через 1, 3, 8 и 10 сут после последнего введения CCl_4 . Условия выделения митохондрий, определение скорости дыхания и активности НАД·Н-оксидазы, сукцинатоксидазы и цитохром *c*-оксидазы митохондрий, а также способы выражения активности, дыхательного контроля (ДК) и отношения АДФ/О не отличались от описанных ранее [5, 6]. Обработка трипсином и фосфолипазой D, условия тепловой инкубации митохондрий и применяемые реагенты были такими же, что и в работе [7]. Активность динитрофенол (ДНФ)-стимулируемой АТФ-азы митохондрий определяли по изменению концентрации ионов водорода [18].

Результаты и обсуждение

Известно, что при гепатите, вызванном введением CCl_4 , в митохондриях печени наблюдается нарушение процессов дыхания и окислительного фосфорилирования [14—22]. Данные, полученные в наших экспериментах, также свидетельствуют, что при гепатите (табл. 1) снижается скорость дыхания в активном состоянии при добавлении АДФ (V_a), в результате чего уменьшается эффективность окислительного фосфорилирования, оцениваемая по коэффициенту АДФ/О и ДК. Параллельно с этим происходит резкое снижение активности ДНФ-активируемой АТФ-азы митохондрий. Следовательно, при гепатите наблюдается не только разобщение окисления и фосфорилирования, но и происходит ингибирование транспорта электронов и протонной проводимости. Аналогичные результаты получены при окислении α -кетоглутарата. Это согласуется с данными других авторов [16, 23], которые отмечают, что при окислении НАД-зависимых субстратов изменения выражены более, чем при окислении сукцината. Действительно, если проводить измерения активности НАД·Н-оксидазы после однократного замораживания и оттаивания митохондрий, выделенных из печени крыс с гепатитом, то указанная активность оказывается почти в $3^{1/2}$ раза ниже нормальной. У таких митохондрий понижается активность не только НАД·Н-оксидазы, но также и сукцинатоксидазы и цитохром *c*-оксидазы (рис. 1). Еще более существенная разница между перечисленными полиферментными системами митохондрий, выделенных из печени крыс с гепатитом и контрольных животных, наблюдается при тепловой деградации митохондрий. Инкубация при 36°C вызывает значительно более быструю инактивацию изучаемых систем в митохондриях, выделенных из печени крыс с гепатитом, по сравнению с нормальными животными. Одновременно с этим наблюдается изменение распределения полиферментных систем по стабильности. В норме наиболее термолабильной системой дыхательной цепи митохондрий является НАД·Н-оксидаза, более стабильна сукцинатоксидаза и наибольшая стабильность характерна для цитохром *c*-оксидазы. При ге-

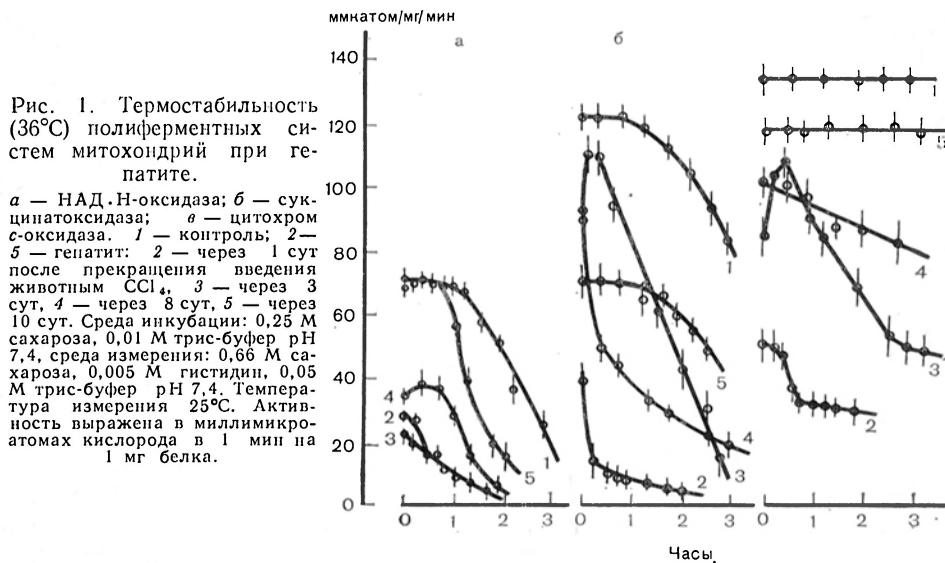
Таблица 1

Потребление кислорода и параметры сопряжения митохондрий печени крыс при гепатите

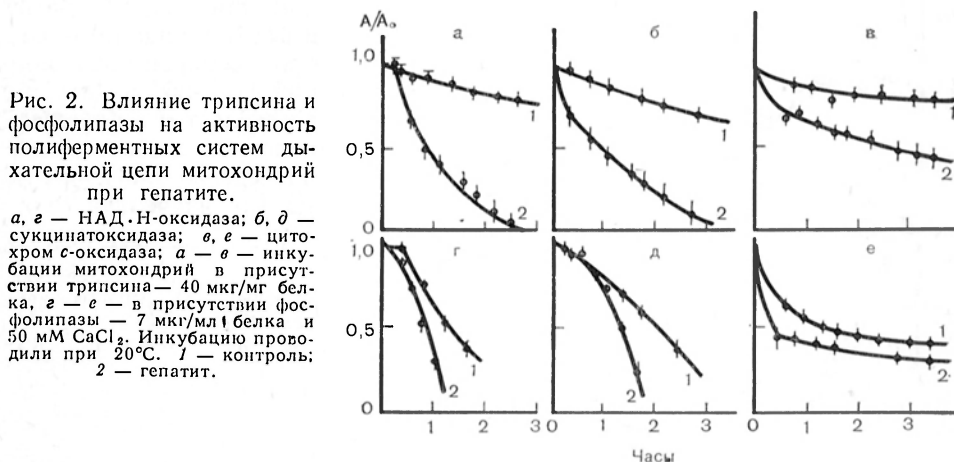
| Показатель | Субстрат | Скорость дыхания, ммкатом кислорода в 1 мин на 1 мг белка | | | | |
|--|---|--|---|--|--|---|
| | | контроль | гепатит | | | |
| | | | срок после прекращения введения CCl_4 , сут | | | |
| | | | 1-е (6) | 3-и (11) | 8-е (6) | 10-е (5) |
| V_2^* V_3 V_4 ДК (V_3/V_4) АДФ/О | Сукцинат, 10 мм АДФ, 200 мкМ | $37,0 \pm 4,3$ $110,0 \pm 4,0$ $30,0 \pm 3,0$ $3,70 \pm 0,34$ $1,80 \pm 0,05$ | $27,0 \pm 4,6$ $70,0 \pm 6,0$ $26,0 \pm 4,4$ $2,60 \pm 0,82$ $1,53 \pm 0,24$ | $24,7 \pm 3,6$ $66,0 \pm 12,4$ $22,4 \pm 1,9$ $2,94 \pm 0,63$ $1,46 \pm 0,17$ | $24,6 \pm 1,8$ $80,0 \pm 11,8$ $22,6 \pm 3,2$ $3,54 \pm 0,22$ $1,66 \pm 0,03$ | $30,0 \pm 4,3$ $90,0 \pm 13,3$ $25,0 \pm 2,6$ $3,60 \pm 0,50$ $1,87 \pm 0,04$ |
| V_3 V_4 ДК АДФ/О +ДНФ | АДФ, 200 мкМ $5 \cdot 10^{-5}$ М | $103,0 \pm 14,7$ $27,7 \pm 5,0$ $3,72 \pm 0,15$ $1,82 \pm 0,11$ $125,0 \pm 12,0$ | $70,0 \pm 4,4$ $35,0 \pm 7,0$ $2,00 \pm 0,10$ $1,57 \pm 0,09$ $110,0 \pm 6,0$ | $64,0 \pm 16,0$ $22,4 \pm 3,2$ $2,85 \pm 0,46$ $1,53 \pm 0,09$ $83,4 \pm 11,0$ | $71,4 \pm 13,0$ $21,4 \pm 3,4$ $3,33 \pm 0,07$ $1,60 \pm 0,06$ $98,0 \pm 19,0$ | $86,0 \pm 14,0$ $23,0 \pm 3,5$ $3,74 \pm 0,43$ $1,96 \pm 0,05$ $123,0 \pm 20,0$ |
| V_2 V_3 V_4 ДК АДФ/О | α -кетоглутарат, 10мМ АДФ, 200 мкМ | $30,0 \pm 4,7$ $90,0 \pm 7,0$ $27,7 \pm 4,7$ $3,25 \pm 0,21$ $3,05 \pm 0,04$ | $22,6 \pm 3,6$ $54,6 \pm 2,2$ $26,0 \pm 6,8$ $2,10 \pm 0,73$ $2,04 \pm 0,01$ | $22,0 \pm 4,0$ $55,4 \pm 2,2$ $16,6 \pm 4,0$ $3,34 \pm 0,94$ $2,74 \pm 0,21$ | $23,4 \pm 2,2$ $68,6 \pm 13,6$ $17,4 \pm 2,2$ $3,94 \pm 0,42$ $2,83 \pm 0,06$ | $31,0 \pm 6,0$ $97,0 \pm 9,0$ $27,0 \pm 4,1$ $3,59 \pm 0,54$ $2,94 \pm 0,11$ |
| V_3 V_4 ДК АДФ/О | АДФ, 200 мкМ | $90,0 \pm 6,0$ $26,0 \pm 5,0$ $3,46 \pm 0,82$ $3,00 \pm 0,08$ | $41,0 \pm 5,0$ $27,0 \pm 7,4$ $1,52 \pm 0,74$ $2,12 \pm 0,11$ | $48,0 \pm 2,7$ $15,4 \pm 4,0$ $3,11 \pm 0,81$ $2,73 \pm 0,24$ | $56,0 \pm 10,6$ $15,4 \pm 2,2$ $3,64 \pm 0,43$ $2,86 \pm 0,04$ | $91,0 \pm 9,3$ $22,7 \pm 3,1$ $4,00 \pm 0,43$ $2,94 \pm 0,08$ |
| +ДНФ | $5 \cdot 10^{-5}$ М | $87,0 \pm 8,0$ | $31,0 \pm 3,2$ | $36,6 \pm 2,2$ | $48,6 \pm 7,6$ | $71,0 \pm 7,4$ |
| Активность АТФ-азы | АТФ, 2,5 мМ ДНФ, $6 \cdot 10^{-5}$ М | $2,17 \pm 0,21$ $43,0 \pm 8,1$ | $2,07 \pm 1,51$ $27,0 \pm 4,0$ | $2,44 \pm 1,68$ $23,0 \pm 3,0$ | $5,07 \pm 1,01$ $36,0 \pm 7,7$ | $5,42 \pm 0,89$ $34,0 \pm 3,7$ |

Примечание. Обозначения скоростей дыхания такие же, как в работе [7]. Активность АТФ-азы выражали в микромолях H^+ в 1 мин на 1 мг белка митохондрий. Здесь и в табл. 2 в скобках — число крыс.

патите за это же время с наибольшей скоростью инактивируется сукцинат-оксидазная система. Цитохром *c*-оксидазная система также дестабилизируется в значительной степени, а НАД.Н-оксидазная система хотя и имеет при гепатите пониженную активность, однако подвергается инаktivации медленно. Такое распределение по стабильности не противоречит существующим представлениям о структурной организации дыхательной цепи,



так как активность цитохром *c*-оксидазы достаточно высока, чтобы даже в деградированном состоянии обеспечить нормальную скорость переноса электронов по НАД.Н-оксидазной и сукцинатоксидазной цепи. Основным заключением, вытекающим из представленных выше данных, можно считать, что митохондрии, выделенные из печени, пораженной CCl_4 , имеют не только пониженную скорость окисления субстратов, но и низкую стабильность к нагреванию. После прекращения введения CCl_4 скорость окисления



субстратов и стабильность полиферментных систем митохондрий постепенно восстанавливаются. Через 3 сут после прекращения введения CCl_4 скорость окисления сукцината остается все еще низкой, однако ДК увеличивается за счет незначительного снижения скорости окисления в состоянии К (V_4). Нормализация эффективности окислительного фосфорилирования (АДФ/О и ДК) наблюдается с α -кетоглутаратом в большей степени, чем с сукцина-

том. Через 8 и 10 сут значения исследуемых параметров восстанавливаются почти до контрольного уровня. Аналогичные данные получены для общей активности АТФ-азы и ДНФ-активируемой АТФ-азы. Более четко динамика восстановления нормального состояния после прекращения введения CCl_4 прослеживается по кривым инактивации при 36°C . На рис. 1

Т а б л и ц а 2

Изменение цитохром с активируемой НАД·Н-оксидазы митохондрий печени крыс при гепатите при действии трипсина

| Условия опыта | Активность НАД·Н-оксидазы, ммктом кислорода в 1 мин на 1 мг белка | | | |
|-------------------------------------|---|----------------|-----------------|----------------|
| | контроль (6) | | гепатит (5) | |
| | — трипсин | + трипсин | — трипсин | + трипсин |
| 1. В присутствии 0,5 мг цитохрома с | $110,6 \pm 8,2$ | $96,4 \pm 7,6$ | $132,5 \pm 9,8$ | $31,4 \pm 2,1$ |
| 2. В отсутствие цитохрома с | $50,6 \pm 3,6$ | $56,0 \pm 3,9$ | $32,5 \pm 2,8$ | $31,4 \pm 2,1$ |
| 3. Разница между 1 и 2 | $60,0 \pm 4,3$ | $40,4 \pm 4,8$ | $100,0 \pm 9,2$ | 0 |

видно, что стабильность НАД·Н-оксидазы, сукцинатоксидазы и цитохром с-оксидазы постепенно возрастает и на 10-е сутки уже мало отличается от соответствующих величин для митохондрий из печени контрольных крыс.

Представляло интерес установить, что является причиной пониженной стабильности полиферментных систем митохондрий крыс с гепатитом при тепловых воздействиях.

Имеется ряд исследований, в которых показано, что пониженная стабильность дыхательной системы митохондрий связана с нарушениями структурных взаимоотношений между белками и фосфолипидами в составе мембран митохондрий [24—26]. Для доказательства этого предположения нами были проведены эксперименты по изучению под-

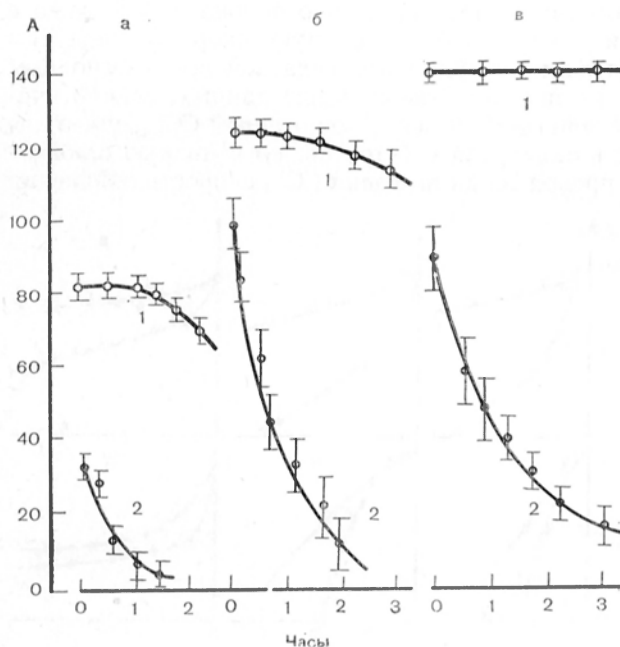


Рис. 3. Активность НАД·Н-оксидазы (а), сукцинатоксидазы (б) и цитохром с-оксидазы (в) митохондрий при 20°C в присутствии цитохрома с (0,14 мг на 1 мг белка). 1 — контроль; 2 — гепатит (3-и сутки).

верженности белков митохондрий действию протеолитического фермента трипсина и фосфолипидов — действию фосфолипазы D. На рис. 2 видно, что белки мембран митохондрий, выделенных из печени крыс с гепатитом, более подвержены действию трипсина независимо от того, какая из полиферментных систем внутренней мембраны митохондрий выбрана для детектирования расщепляющего действия трипсина. То же самое следует и из опытов по гидролизу фосфолипидов мембран фосфолипазой D: при гепатите

связь между белками и фосфолипидами мембран митохондрий становится менее прочной, что приводит к увеличению подверженности этих компонентов действию литических ферментов. Интересно отметить, что трипсин в первую очередь расщепляет те участки мембран, которые ответственны за включение цитохрома *c*. Так, в норме активность цитохром *c*-активируемой НАД·Н-оксидазы под влиянием трипсина уменьшается лишь на 30 %, в то время как при патологии после действия на митохондрии трипсина эта активность полностью исчезает (табл. 2). Этот факт косвенным образом свидетельствует также о том, что включение цитохрома *c* в структуру митохондрий при патологии меняется. Известно, что при инкубации митохонд-

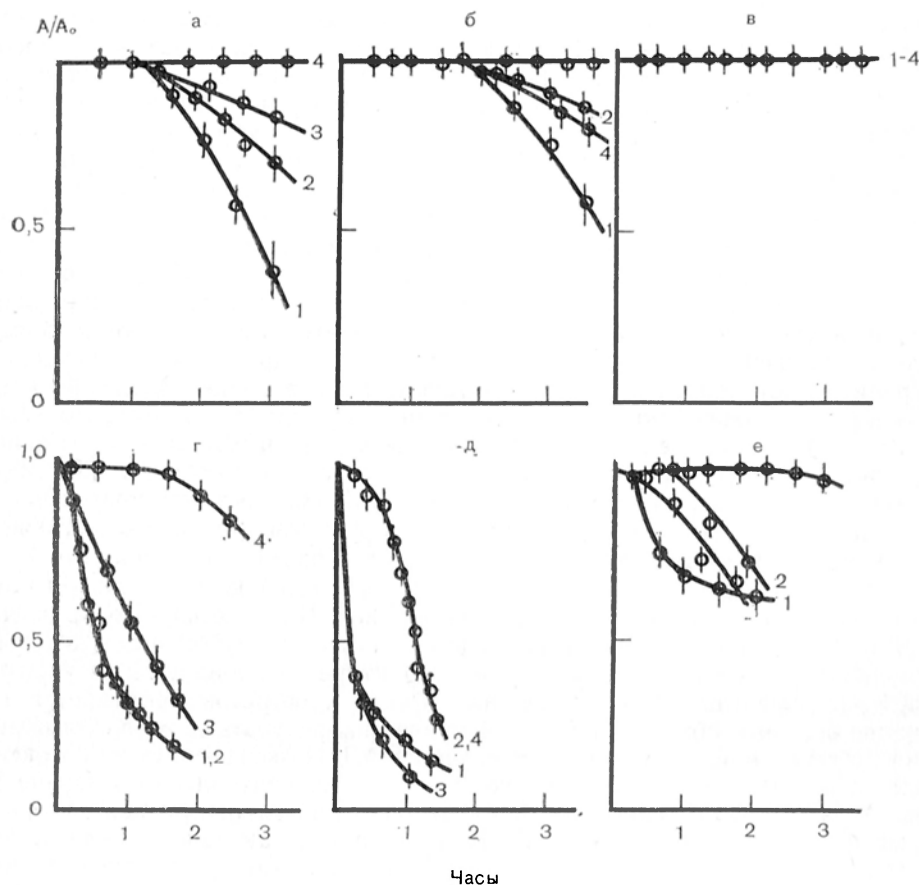


Рис. 4. Защитное действие субстратов на тепловую деградацию НАД·Н-оксидазы (а, е), сукцинатоксидазы (б, д) и цитохром *c*-оксидазы (в, е) митохондрий печени при 36°C.

а — в — контроль; 2 — е — гепатит (1-е сутки). 1 — тепловая инактивация митохондрий в отсутствие субстратов; 2 — то же в присутствии НАД·Н (25 мкмоль/мл); 3 — в присутствии сукцината (100 мкмоль/мл); 4 — в присутствии смеси НАД·Н (25 мкмоль/мл), сукцината (100 мкмоль/мл) и цитохрома *c* (10 мг/мл). Концентрация белка при инкубации 70 мг/мл, количество митохондрий при измерении активности 2 мг (по содержанию белка). A_0 — ферментативная активность образцов, не подвергавшихся нагреванию; A — активность в процессе тепловой инкубации при 36°C.

рий, выделенных из печени нормальных крыс при 20 и 36°C, вымывание цитохрома *c* из митохондрий происходит с небольшой скоростью. Кинетика инактивации НАД·Н-оксидазы нормальных митохондрий почти в равной степени не зависит как от присутствия, так и от отсутствия цитохрома *c* (сравните кривую 1 на рис. 3, а с кривой 1 на рис. 1, а). У крыс с гепатитом также отмечается «включение» цитохрома *c* в митохондрии, что проявляется в небольшом увеличении активности полиферментных систем. Однако в процессе тепловой деградации активность резко снижается (сравните

кривую 2 на рис. 3, а с кривой 3 на рис. 1, а), несмотря на то что в системе инкубации имеется достаточное количество цитохрома *c*. Аналогичная зависимость получена и для сукцинатоксидазы (см. рис. 1, б и рис. 3, б). Эти результаты свидетельствуют о том, что способность мембран к удержанию белкового переносчика, каким является цитохром *c*, в условиях патологии уменьшается. Наблюдается также десорбция эндогенного цитохрома *c*, однако этот процесс протекает медленнее. Зависимости, полученные при исследовании НАД·Н-оксидазной и сукцинатоксидазной систем, где цитохром *c* служит переносчиком электронов, а также цитохром *c*-оксидазы, где этот белок выступает в качестве субстрата, сходны (см. рис. 3, а—в).

Таким образом, кинетика десорбции цитохрома *c* из мембран также свидетельствует об изменении при гепатите способности мембран митохондрий к удержанию экзогенных белков, а следовательно, и о нарушении прочности связей между фосфолипидами и белками. При этом совершенно неизвестны конкретные изменения в структуре фосфолипидов и белков при гепатите. Повышение доступности фосфолипидов мембран действию фосфолипазы D и белков действию трипсина в митохондриях, выделенных из печени крыс с гепатитом, позволяет сделать предположение о природе пониженной стабильности митохондрий к нагреванию. Известно, что в состав митохондрий входят фосфолипаза A₂ [27, 28] и протеазы [29, 30]. Не исключено, что при гепатите содержание или активность этих ферментов изменяется, что приводит при нагревании к интенсификации литических процессов и уменьшению стабильности полиферментных систем митохондрий. Однако сведения об активности внутримитохондриальных литических ферментов при гепатите пока отсутствуют. Если это предположение правильно, то должен проявляться «защитный эффект» субстратов, который заключается в повышенной стабильности дыхательной цепи и системы окислительного фосфорилирования в функционирующем состоянии [25, 26]. Известно, что дыхательная цепь митохондрий обладает устойчивостью к внешним воздействиям (тепло, трипсин, фосфолипазы), если осуществляется перенос электронов по дыхательной цепи. Повышенная стабильность в функционирующем состоянии обусловлена более прочным контактом белков и фосфолипидов мембран митохондрий [25]. В митохондриях, выделенных из печени крыс с гепатитом, когда наблюдаются глубокие структурные изменения как в самой печени, так и в структуре митохондрий в результате введения животным CCl₄, защитный эффект субстратов проявляется не вполне обычным образом. На рис. 4 приведены результаты изучения влияния субстратов на кинетику инактивации НАД·Н-оксидазы, сукцинатоксидазы и цитохром *c*-оксидазы митохондрий печени контрольных и подопытных крыс при 36°C. При инкубации митохондрий из печени контрольных крыс в аэробных условиях НАД·Н предохраняет активность сукцинатоксидазы от деградации. В то же время сукцинат также предохраняет от деградации НАД·Н-оксидазную систему. В отличие от митохондрий, выделенных из печени нормальных крыс, когда окисление НАД·Н или сукцината приводит к стабилизации всей дыхательной цепи и ее звеньев, в митохондриях крыс с гепатитом проявляется лишь «перекрестный эффект субстратов» [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Рачев Р. Р. Митохондрии и тиреоидные гормоны. Л., 1969. — 2. Соколовой В. И., Владимиров Ю. А. — В кн.: Молекулярная патология мембранных структур. М., 1975, с. 12. — 3. Разумович А. Н. Биоэнергетические процессы и старение организма. Минск, 1972. — 4. Kitahiga O., Ozawa K., Nonjo J. P. — *Am. J. Surg.*, 1973, v. 126, p. 379. — 5. Алматов К. Т., Аулов Д. М., Ахмеров Р. Н. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 1, с. 96. — 6. Алматов К. Т., Рахимов М. М. — *Узбекск. биол. ж.*, 1977, № 4, с. 3. — 7. Рахимов М. М., Алматов К. Т. — *Биохимия*, 1977, т. 42, № 10. — 8. Алматов К. Т., Рахимов М. М. — *Онтогенез*, 1977, — с. 1852. — 9. Sidley J. A., Higgins D. M., Fleisher D. A. — *Arch. Path.*, 1955, v. 59, p. 712. — 10. Klein A., Hoffman J. — *Ibid.*, 1960, v. 3,

p. 70. — 11. Rees K. R., Sinha K. P., Spector W. D. — J. Path. Bact., 1961, v. 81, p. 107. — 12. Яхнина Д. Н. — Бюлл. exper. биол., 1962, № 4, с. 69. — 13. Шамрай Е. Ф., Селезнова А. К. — Вopr. мед. химии, 1969, т. 15, с. 512. — 14. Dianzani M. — Biochim. biophys. Acta, 1954, v. 14, p. 514. — 15. Resnagel R. O. — Pharmacol. Rev., 1967, v. 19, p. 145. — 16. Slater T. F., Sawler B. C. — Biochem. J., 1971, v. 123, p. 815. — 17. Роттенберг Ю. С., Сербиновская Н. А. — В кн.: Митохондрии. Регуляция процессов окисления и сопряжения. М., 1974, с. 164. — 18. Chance B., Nishimura M. — Meth. Enzymol., 1967, v. 2, p. 10. — 19. Фундер Н. — Вopr. мед. химии, 1968, т. 14, с. 130. — 20. Gaгаfoli E., Tiozzo R. — Exp. molec. Path., 1968, v. 9, p. 131. — 21. Роттенберг Ю. С., Сербиновская Н. А. — В кн.: Итоги координации исследований по теме «Регуляция энергетического обмена и устойчивость организма». Пущино, 1975, с. 206. — 22. Каримов Х. Я. — В кн.: Механизмы повреждения, резистентности, адаптации и компенсации. Ташкент, 1976, т. 2, с. 35. — 23. Lyashevich V. V. et al. — Biochem. Pharmacol., 1971, v. 20, p. 1443. — 24. Лузиков В. Н., Рахимов М. М., Березин И. В. — Биохимия, 1968, т. 33, с. 1115. — 25. Luzikov V. N., Rakhimov M. M., Berezin I. V. — Biochim. biophys. Acta, 1969, v. 180, p. 429. — 26. Лузиков В. Н. — Успехи совр. биол., 1976, т. 81, с. 8. — 27. Shegrov G. L., Van Deenen L. L. M. — Biochim. biophys. Acta, 1965, v. 98, p. 207. — 28. Rossi C. R., Sartorelli L., Boretta L. et al. — Ibid., p. 207. — 29. Lovaas E. — FFBS Letters, 1974, v. 45, p. 244. — 30. Володина Т. В., Козельцев В. Л., Ребров Л. Б. и др. — Вopr. мед. химии, 1977, № 3, с. 338.

Поступила 1/IX 1977 г.

FUNCTION OF RAT LIVER MITOCHONDRIA IN HEPATITIS

K. T. Almatov, M. M. Rakhimov

Laboratory of Experimental Gastroenterology, Research Institute of Regional Medicine,
Ministry of Public Health of the Uzbek SSR, Tashkent

Parameters of oxidative phosphorylation, the rate of respiration in various metabolic conditions as well as an activity and stability of mitochondrial polyenzyme systems were altered in rats with experimental hepatitis, treated with CCl₄. Proteins and phospholipids from mitochondrial membranes proved to be more susceptible to the effect of trypsin and phospholipase D. Kinetics of cytochrome C desorption from membranes and mitochondria demonstrated that capacity of these membranes to confine the exogenous proteins was altered in hepatitis.

УДК 616.127-005.8-092:616.153:577.175.85

Р. А. Фролькис, Л. М. Гунина

ИЗМЕНЕНИЯ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

Украинский научно-исследовательский институт кардиологии им. Н. Д. Стражеско, Киев

Исследованы компоненты кининовой системы крови — брадикининоген, калликреиноген, калликреин, кининаза I, а также БАЭЭ¹-эстеразная и антитриптическая активность — в процессе развития крупноочагового инфаркта миокарда у собак. Выявлена активация ряда компонентов кининовой системы, отчетливо проявляющаяся уже через 1 ч и максимально выраженная через 3 ч после перевязки коронарной артерии. В этот период содержание брадикининогена снижено до 42% от исходного уровня, активность калликреина повышена в 6—8 раз, уровень калликреиногена снижен в 2 раза, БАЭЭ-эстеразная активность крови умеренно возрастает. Одновременно отмечено торможение кининазы I на 30—40% и угнетение антитриптической активности. В дальнейшем наблюдается постепенная нормализация отдельных показателей: кининазы I на 5-е сутки, калликреиногена, калликреина, брадикининогена на 10-е сутки инфаркта миокарда. Антитриптическая активность крови не только достигает нормальных значений, но превышает их на протяжении 2 сут после лигирования коронарной артерии. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о гиперпродукции кининов и возможности потенцирования и пролонгирования их действия со всеми свойственными этим полипептидам физиологическими и патофизиологическими эффектами.

¹ БАЭЭ — этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина.

Кинины крови играют важную роль в гуморальной регуляции и поддержании гомеостаза. Наиболее характерным свойством кининов является вазоактивная направленность их действия: способность в чрезвычайно малых концентрациях понижать тонус сосудов, стимулировать коронарный кровоток и работу сердца, изменять проницаемость клеточных мембран [1—4].

Проведенные за последние годы исследования показали существенную роль кининовой системы в патогенезе ишемической болезни сердца и ее осложнений. Установлена значительная активация кининовой системы крови у больных инфарктом миокарда, показана корреляция клинического течения болезни со степенью изменения отдельных компонентов этой системы [5—8]. Так, например, выявлена четкая зависимость между содержанием брадикининогена и тяжестью состояния больного. Наиболее выраженное снижение брадикининогена зарегистрировано у больных с длительным болевым синдромом, отеком легких, снижением артериального давления, при развитии острой левожелудочковой недостаточности [9—11]. При неосложненном течении инфаркта миокарда содержание брадикининогена нормализуется на 8—10-е сутки, а при кардиогенном тоне — на 30-е [9]. Все это позволило связать многие проявления коронарной недостаточности — боль, нарушения периферического кровообращения и микроциркуляции вплоть до шока и коллапса — с биологическими свойствами кининов.

Таким образом, благодаря клиническим исследованиям было выявлено общее направление изменений кининовой системы крови и во многом стало понятным их место в патогенезе и клинике инфаркта миокарда. Вместе с тем только в экспериментальных исследованиях можно было установить истинные причинно-следственные взаимоотношения между ишемией и реакцией кининовой системы, выявить время появления первых изменений и максимального их нарастания и, наконец, установить механизм их возникновения.

К сожалению, эти исследования пока немногочисленны. Первыми в этом направлении были работы О. А. Гомазкова и соавт. [11, 12], установивших отчетливые изменения содержания кининов уже через 30 мин после воспроизведения инфаркта миокарда у крыс. Обнаруженные изменения — снижение содержания контактного прекалликреина, «стеклянного» кининогена, угнетение ингибиторов калликреина — указывали на активацию кининовой системы. Еще более ранние нарушения выявлены в опытах Т. И. Стукаловой и соавт. [13], показавших снижение уровня брадикининогена крови через 1 мин после перевязки коронарной артерии у собак. В дальнейшем уровень брадикининогена продолжает снижаться, активность кининазы снижается, а калликреина возрастает в 2 раза. Максимум сдвигов, по данным авторов, наблюдается через 2 ч, а их нормализация — к 10-м суткам течения инфаркта миокарда. Изменения содержания кининов оценивали параллельно с реакцией симпатико-адреналовой системы и содержанием катехоламинов в крови и тканях. При этом отмечена значительная активация кининообразования под влиянием адреналина, введенного в острый период инфаркта миокарда.

Вместе с тем при сопоставлении экспериментальных и клинических исследований обнаруживаются определенные противоречия. Так, в клинических работах активация кининов наиболее выражена на 2-е сутки развития инфаркта миокарда, в то время как в экспериментальных исследованиях максимум сдвигов определяется значительно раньше — в первые часы после лигирования коронарной артерии. Расхождения существуют и в оценке степени и направленности изменений отдельных компонентов кининовой системы: например, отмечена активация кининазы — по данным клинических исследований и торможение этого фактора — по результатам экспериментальных. Использование небольшого числа одновременно определяемых показателей, неоднотипность методических подходов затрудняют исчерпы-

вающую характеристику состояния кининовой системы при инфаркте миокарда, что служит основанием к дальнейшим исследованиям.

Нами было проведено изучение комплекса показателей кининовой системы крови — брадикининогена, калликреиногена, калликреина, кининазы, БАЭЭ-эстеразной и антитриптической активности (АТА) крови — в динамике развития экспериментального инфаркта миокарда, что позволяло проследить за изменениями основных звеньев, ответственных за образование и разрушение кининов крови при данной патологии.

М е т о д и к а

Опыты проведены на 35 собаках, у которых воспроизводили крупноочаговый инфаркт миокарда передней стенки левого желудочка путем высокой перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии. В разные сроки после операции — через 1 ч, 3 ч и 1, 2, 5 и 10 сут — у животных исследовали показатели калликреин-кининовой системы в венозной крови.

Содержание брадикининогена определяли биологическим методом [14] в модификации [15] по сокращению изолированного рога матки крысы. Результаты выражали в микрограммах брадикинина, освобожденного под действием трипсина из 1 мл сыворотки.

Активность калликреиногена и содержание калликреина определяли специфическим хроматографическим методом [16], включающим на первом этапе получение неадсорбированной фракции белков сыворотки крови на ДЭАЭ-сефадексе А-50 при рН 7,0 и на втором этапе — измерение активности калликреиногена и калликреина спектрофотометрически по скорости гидролиза БАЭЭ. Результаты выражали в миллиединицах (мед.) калликреина и калликреиногена в 1 мл сыворотки, принимая за 1 мед. количество фермента, гидролизующее 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C. Общую БАЭЭ-эстеразную активность сыворотки крови измеряли спектрофотометрически [17]. Результаты выражали в миллиэстеразных единицах (МЭЕ), принимая за 1 МЭЕ способность гидролизовать 1 мкмоль БАЭЭ 1 мл сыворотки за 1 мин.

Активность кининазы I (карбоксипептидазы N) определяли спектрофотометрическим методом [18] в модификации [19], используя в качестве субстрата гиппурил-L-лизин (ГЛ). Активность выражали в микромолях ГЛ, расщепленного 1 мл сыворотки за 1 мин.

Общую АТА измеряли спектрофотометрическим методом [19] по торможению БАЭЭ-эстеразной активности трипсина. Результаты выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ), принимая за 1 ИЕ количество сыворотки крови, которое тормозит расщепление трипсином 1 мкмоль БАЭЭ за 1 мин при 25°C.

Контролем служили 16 здоровых собак и 6 собак, у которых была произведена торакотомия, но без последующей перевязки коронарных сосудов.

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

Исследования показали, что торакотомия без перевязки коронарных сосудов не сопровождается достоверными изменениями кининовой системы. Изменения, обнаруженные через 1 ч, нормализуются уже через 3 ч после торакотомии (табл. 1).

Данные по содержанию отдельных компонентов кининовой системы, БАЭЭ-эстеразной активности и АТА сыворотки крови в разные сроки развития и течения инфаркта миокарда приведены в табл. 2, где эти результаты сопоставлены с соответствующими показателями у здоровых животных.

Как видно из табл. 2, после лигирования коронарной артерии возникают закономерные изменения основных показателей кининовой системы с характерной для каждого компонента динамикой изменений. Так, уже через 1 ч после перевязки коронарной артерии наблюдается значительное снижение брадикининогена в крови, минимальный уровень которого (42% от нормы) отмечается через 3 ч. В дальнейшем содержание кининогена возрастает, однако концентрация его еще заметно снижена через 1—2 сут и достигает нормальных значений только на 10-е сутки развития инфаркта миокарда.

Как показали полученные данные, после лигирования коронарной артерии возникают существенные изменения в системах, связанных с кининообразованием. В сыворотке крови быстро появляется свободный калликреин, практически отсутствующий у здоровых животных. Уровень его через 1 ч составляет $110 \pm 2,29$ мед., а через 3 ч — $148 \pm 7,69$ мед. Высокая

активность калликреина сохраняется на протяжении 5 сут эксперимента, превышая нормальный уровень в 5—6 раз. Содержание неактивного предшественника калликреина — калликреиногена — снижается в 2 раза уже в первые часы после перевязки коронарных сосудов. В последующие сроки наблюдений, через 1 и 2 сут, содержание калликреиногена несколько увеличивается, но остается ниже нормы и через 5 сут наблюдений. Нормализация этого показателя, так же как и калликреина, наблюдается к 10-м суткам развития инфаркта миокарда.

Т а б л и ц а 1

Некоторые компоненты калликреин-кининовой системы собак при торакотомии

| Группа животных | Калликреиноген, мед/мл | Калликреин, мед/мл | Кининоген, мкг/мл | Общая БАЭЭ-эстеразная активность, МЭЕ/мл |
|--------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|--|
| Животные с торакотомией: | | | | |
| через 1 ч | 327±8,8 | 45,2±6,4 | 3,63±0,11 | 305±13,0 |
| <i>P</i> | <0,01 | <0,01 | <0,05 | >0,01 |
| через 3 ч | 368±19,5 | 17,7±1,9 | 4,24±0,10 | 309±13,0 |
| <i>P</i> | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 |
| через 1 сут | 377±12,9 | 18,5±3,7 | 4,32±0,16 | 279±16,3 |
| <i>P</i> | >0,01 | >0,01 | >0,01 | >0,01 |
| Контрольная | 362±14,41 | 18,06±5,78 | 4,34±0,166 | 281±27,86 |

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 *P* дано по сравнению с контрольной группой (здоровые, 16 животных).

Значительное уменьшение уровня калликреиногена в первые часы после развития очаговой ишемии миокарда связано, по-видимому, с ускоренным превращением его в активную форму. При этом интересно отметить, что содержание калликреиногена снижается в 2 раза, в то время как активность самого калликреина возрастает в 6—8 раз, т. е. наблюдается преобладание прироста свободного калликреина над степенью истощения запасов его предшественника в крови. Возможно, это связано с высвобождением дополнительного количества свободного калликреина за счет торможения ингибиторов, в комплексе с которыми он циркулирует в крови в физиологических условиях. В связи с этим следует отметить, что при инфаркте миокарда отмечено угнетение ингибиторов калликреина в крови [11].

Нами проведено исследование общей АТА крови, по существу отражающей изменения содержания свободного, не связанного с протеиназами, α_1 -антитрипсина [20, 21]. Как показали исследования, умеренное снижение АТА наблюдается через 3 ч, составляя в этот период 68% от нормы. Однако спустя 1 сут АТА крови восстанавливается, а через 2 сут даже превышает нормальный уровень ($P < 0,01$). Восстановление исходной АТА происходит к 5-м суткам развития инфаркта миокарда.

Согласно современным представлениям, α_1 -антитрипсин, определяемый этим методом, является быстрым и сильным ингибитором нейтральных протеиназ лейкоцитов и, следовательно, может блокировать образование токсических и вазоактивных веществ, освобождающихся из лейкоцитов под влиянием протеиназ [21]. Повышение АТА крови в период формирования и организации инфаркта можно, по-видимому, рассматривать как компенсаторную реакцию противовоспалительной и антидеструктивной направленности.

Представляют интерес данные, полученные при определении общей БАЭЭ-эстеразной активности крови, отражающей, как известно, активность многих трипсиноподобных ферментов сыворотки — калликреина, плазмина,

тромбина, активированного фактора Хагема-на, а также комплексов этих ферментов с α_2 -макроглобулином.

Как видно из приведенных в табл. 2 данных, спонтанная БАЭЭ-эстеразная активность сыворотки повышается уже через 1 ч, но значительно через 3 ч после развития ишемии и остается на более высоком, чем в норме, уровне в последующие 5 сут эксперимента. Если в нормальных условиях калликреин составляет 6—7% от общей БАЭЭ-эстеразной активности сыворотки крови, то после развития инфаркта миокарда доля калликреина возрастает до 30—40%. Активация ферментов трипсинового типа весьма умеренна и выражена в наибольшей степени в первые часы развития инфаркта, что объясняется, по-видимому, резким повышением в этот период уровня калликреина и угнетением его ингибиторов.

Важным регулирующим фактором состояния кининовой системы являются кининазы. Нами проведено изучение специфической кининазы I (карбоксипептидазы N), участвующей в распаде брадикинина. Исследования показали, что после перевязки коронарной артерии каталитическая активность этого фермента не только не возрастает, но отчетливо угнетается, достигая наиболее низких значений (60% от контрольного уровня) через 3 ч. В последующие сутки также наблюдается более низкая, чем в нор-

Таблица 2

Компоненты калликреин-кининовой системы крови при экспериментальном инфаркте миокарда у собак

| Группа животных | Калликреиноген, мед/мл | Калликреин, мед/мл | Кининоген, мкг/мл | Кининаза, мкмоль ГК/мл/мин | Общая БАЭЭ-эстеразная активность, МЭЕ/мл | АТА, ИЕ/мл |
|--|--|--|---|---|--|---|
| Животные с инфарктом миокарда длительностью: 1 ч (15) P 3 ч (15) P 1 сут (15) P 2 сут (10) P 5 сут (10) P 10 сут (8) P | 192±7,12 <0,01 167±4,18 <0,02 188±5,12 <0,01 196±10,61 <0,01 256±11,07 <0,02 357±12,4 >0,01 | 110±2,29 <0,01 148±7,19 <0,001 121±12,7 <0,01 108±8,22 <0,001 96,5±10,61 <0,001 33,4±7,05 >0,01 | 2,18±0,032 <0,001 1,84±0,054 <0,001 2,18±0,067 <0,001 2,86±0,089 <0,001 3,14±0,146 <0,01 4,17±0,19 >0,05 | 0,241±0,012 <0,001 0,205±0,012 <0,01 0,255±0,044 <0,01 0,292±0,006 <0,001 0,305±0,013 >0,01 0,301±0,09 >0,05 | 340±7,51 <0,001 370±11,3 <0,01 312±15,0 <0,01 292±9,79 >0,001 322±21,3 >0,02 288±15,6 >0,05 | 33,9±3,02 >0,01 25,2±2,25 <0,01 34,8±2,23 >0,01 42,1±2,06 <0,001 37,7±1,86 >0,01 36,9±2,03 >0,05 |
| Контрольная | 362±14,41 | 18,1±5,78 | 4,34±0,166 | 0,310±0,09 | 281±27,86 | 36,4±1,89 |

Примечание. В скобках — число животных.

ме, активность этого фермента, достигающая исходных величин к 5-м суткам течения инфаркта миокарда.

Суммируя полученные данные, можно отметить, что после воспроизведения инфаркта миокарда возникают быстрые и заметные изменения компонентов калликреин-кининовой системы крови: снижение уровня неактивных предшественников брадикинина и калликреина, активация калликреина, БАЭЭ-эстеразной активности крови, торможение кининазы, фазные сдвиги АТА. При этом максимальные изменения наблюдаются через 1—3 ч после перевязки коронарной артерии, однако и в последующем многие компоненты отчетливо изменяются и каждый из них имеет свою характерную динамику нарушений. Обращает на себя внимание наиболее резко выраженное возрастание активности калликреина — в 6—8 раз по сравнению с нормой, что указывает на значительное усиление кининообразования. В то же время изменения активности кининазы весьма умеренны и угнетение фермента сменяется восстановлением его активности к 5-м суткам после воспроизведения инфаркта миокарда. Однако на фоне значительного усиления кининообразования сниженная либо даже близкая к норме активность кининазы свидетельствует о том, что скорость образования кининов во все периоды течения инфаркта миокарда заметно преобладает над интенсивностью их разрушения. Таким образом, гиперпродукция кининов не уравнивается их распадом. Это может приводить к потенцированию и более длительному проявлению свойственных брадикинину эффектов. Так, показано, что при блокировании легочного кининазного «барьера» гипотензивные ответы на брадикинин возрастают в 4—6 раз [22].

Обсуждая механизм обнаруженных изменений, следует прежде всего отметить их непосредственную связь с ишемией миокарда, о чем свидетельствуют быстрота возникающих нарушений и максимум нарастания, наступающий задолго до развития некроза. По-видимому, именно ишемия миокарда и последующие за ней общие и местные сдвиги в обмене являются пусковыми механизмами активации кининовой системы при нарушении коронарного кровообращения.

Убыль энергетических компонентов миокарда — креатинфосфата и АТФ, активация анаэробного пути распада гликогена, накопление недоокисленных продуктов его обмена, сдвиг pH среды и ионного состава, нарушение целостности и проницаемости мембран внутриклеточных органелл, в том числе и лизосом, выход в цитоплазму лизосомальных протеолитических ферментов — основные этапы на пути активации кининовой системы ткани при острой ишемии. Освободившиеся протеазы могут непосредственно влиять на кининоген межклеточной ткани с образованием кининов. Кроме того, с перечисленными выше обменными нарушениями связан «запуск» фактора Хагема — наиболее мощного активатора калликреина. По-видимому, имеют значение сопровождающая острую ишемию миокарда общая и местная реакции симпатико-адреналовой системы и способность катехоламинов стимулировать кининовую систему крови [5, 6, 13, 23]. Многие факторы, активирующие кининообразование, одновременно являются ингибиторами кининаз. Так, образующиеся в процессе свертывания крови и фибринолиза промежуточные соединения, так называемые брадикинин-потенцирующие пептиды, являются конкурентными ингибиторами кининаз [24]. Торможению кининаз способствует также сдвиг pH в кислую сторону.

Условно выделяя компенсаторную и патогенетическую роль кининов при инфаркте миокарда, А. М. Чернух и О. А. Гомазков [25] подчеркивают решающую роль в этом количества образующегося брадикинина. С одной стороны, гипотензивное, коронародилататорное действие брадикинина способствует облегчению работы сердца. Однако значительная гиперпродукция кининов может вызвать резкое снижение артериального давления, которое сопровождается коллапсом, нарушением микроциркуляции, отеком легких.

Таким образом, быстрая реакция кининовой системы крови на ишемию миокарда является закономерной и степень этой реакции необходимо учитывать для предупреждения патофизиологических эффектов этих активных полипептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fox R. H., Hilton S. M. — J. Physiol. (Lond.), 1958, v. 142, p. 219. —
2. Lewis G. P. — Lect. Sci. Basis Med., 1962, v. 14, p. 242—258. — 3. Montague D., Rosas R., Bohr D. — Science, 1963, v. 141, p. 907—908. — 4. Parrott J. R. — Brit. J. Pharmacol., 1964, v. 22, p. 34—36. — 5. Малая Л. Т., Лазарева С. А. — Кардиология, 1974, № 4, с. 39—48. — 6. Голиков А. Н., Бобков А. И., Ивлева В. И. — Там же, 1976, № 2, с. 74—77. — 7. Андреев Г. В., Суворов А. В., Бессолицына Л. А. и др. — Там же, 1977, № 2, с. 70—75. — 8. Kolberg-Posterska B. — Cor et vasa, 1975, v. 17, N 3, p. 169—176. — 9. Малая Л. Т., Беркелиева С. Ч., Лазарева С. А. — Вестн. АМН СССР, 1973, № 3, с. 30—40. — 10. Голиков А. И. — Кровообращение, 1974, № 2, с. 26—29. — 11. Дзининский А. А., Гомазков О. А. Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Новосибирск, 1976. — 12. Гомазков О. А., Большакова Л. В., Шимкович М. В., Комиссарова Н. В. — Кардиология, 1972, № 4, с. 22—28. — 13. Стукалова Т. И., Лазарева С. А., Терновая Л. А. — Вопр. мед. химии, 1975, № 1, с. 88—91. — 14. Diniz C. R., Carvalho I. F. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1963, v. 104, N 2, p. 77—89. — 15. Пасхина Т. С., Егорова Т. П. — Биохимия, 1966, т. 31, с. 468—475. — 16. Пасхина Т. С., Кринская А. В. — Вопр. мед. химии, 1974, № 6, с. 660—662. — 17. Trautschold I., Werle E. — Hoppe — Seylers Z. physiol. Chem., 1961, Bd 325, N 6, S. 48—53. — 18. Folk I. E., Reiz K. A., Carnoll W. K. et al. — J. biol. Chem., 1960, v. 253, p. 2272—2277. — 19. Пасхина Т. С., Яровая Г. А. и др. — Вопр. мед. химии, 1970, № 2, с. 152—161. — 20. Пасхина Т. С., Нартикова В. Ф., Доценко В. Л. и др. — Там же, 1976, № 5, с. 696—707. — 21. Пасхина Т. С., Долгина М. И., Нартикова В. Ф. и др. — Там же, 1977, № 5, с. 689—701. — 22. Гомазков О. А., Шимкович М. В. — Кардиология, 1974, № 7, с. 57—62. — 23. Mashford M. L., Zagest R. — Circulat. Res., 1967, v. 21, N 6, Suppl. 3, p. 183—186. — 24. Пасхина Т. С., Трапезникова С. С., Егорова Т. П. и др. — Биохимия, 1975, т. 40, № 4, с. 844—854. — 25. Чернух А. М., Гомазков О. А. — Пат. физиол., 1976, № 1, с. 5—15.

Поступила 20/IX 1977 г.

ALTERATIONS IN BLOOD KALLIKREIN-KININE SYSTEM IN DYNAMICS OF EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

R. A. Frolikis, L. M. Gunina

N. D. Strajesko Research Institute of Cardiology, Kiev

Bradykininogen, kallikreinogen, kallikrein, kininase I as well as blood BAEE-esterase and antitryptic activities were studied in development of extensive myocardial infarction in dogs. Some components of kinine system were activated already within 1 hr after ligation of coronary artery, maximal their activation was observed within 3 hrs. In this period content of bradykinin was distinctly decreased — up to 42% of the initial level, kallikrein was activated 8-8-fold, content of kallikreinogen was twice decreased and BAEE esterase activity of blood was increased moderately. Simultaneously, inhibition of kininase I by 30-40% and of antitryptic activity was observed. Gradual normalization of the patterns studied occurred further: kininase I — within 5 days, kallikreinogen, kallikrein and bradykinin — within 10 days of infarction development. Antitryptic activity of blood not only reached normal values but exceeded them within 2 days after the artery ligation. The data obtained suggest the hyperproduction of kinins; the possibility is discussed on the potentiation and prolongation of effect of these physiologically active polypeptides.

А. П. Хохлов, В. К. Малаховский

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ЦИКЛИЧЕСКОГО 3',5'-АМФ У БОЛЬНЫХ ПРОГРЕССИРУЮЩИМИ МЫШЕЧНЫМИ ДИСТРОФИЯМИ

Медико-генетический отдел Центральной научно-исследовательской лаборатории I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова

Изучен обмен цАМФ у больных прогрессирующими мышечными дистрофиями. Концентрация цАМФ в мышцах при миопатии Дюшенна резко снижена. Одновременно у больных с этой формой миопатии отмечено снижение базальной активности аденилатциклазы и степени активации ее адреналином и фторидом натрия. Уменьшение активности фосфодиэстеразы имеет, по-видимому, компенсаторный характер. У больных миопатией Эрба и Ландузи — Дежерина концентрация цАМФ, активность и активация аденилатциклазы находятся в пределах нормы. Активность фосфодиэстеразы у больных миопатией Ландузи — Дежерина увеличена. Константа диссоциации связывания цАМФ протеинкиназами у больных с этими формами миопатии снижена более чем в 10 раз.

Несмотря на большое число работ, посвященных изучению молекулярных основ патогенеза нервно-мышечных заболеваний, механизм повреждения мышечного волокна при прогрессирующих мышечных дистрофиях остается невыясненным. Гипотезы, выдвинутые ранее (сосудистые, неврогенные, «дефектных» мембран), подтверждены не были. В то же время анализ данных литературы последних лет дает возможность обнаружить ведущую роль нарушения центральных механизмов регуляции обменных процессов при этом виде патологии. Накоплен обширный материал о нарушении реакций, находящихся под контролем циклических нуклеотидов. Обнаружено снижение процессов фосфорилирования [1], изменение кальцийсвязывающей способности саркоплазматического ретикулума [2], накопление жира [3] и др.

Однако имеющиеся в литературе сведения об обмене циклических нуклеотидов при мышечных заболеваниях немногочисленны и противоречивы. Ряд авторов [4] приводят данные о резко ослаблении гормонального контроля и снижении базальной активности аденилатциклазы при миопатии Дюшенна и некоторых других формах прогрессирующих мышечных дистрофий. Показано также [5] снижение в 2 раза активности аденилатциклазы при миопатии Эрба и одновременное увеличение в $1\frac{1}{2}$ — $2\frac{1}{2}$ раза активности фосфодиэстеразы, тогда как другие авторы [6], используя в качестве субстрата 1 мМ цАМФ, не обнаружили существенных изменений активности последнего фермента при миопатии Дюшенна, Эрба, Ландузи — Дежерина и нервно-мышечных дистрофиях. Сапал и соавт. [7] не выявили изменения активности фосфодиэстеразы у больных миотонией, миастенией, полимиозитом и неврогенными дистрофиями. Лишь у части больных миопатией Дюшенна отмечено снижение активности фермента.

Данных о содержании цАМФ в мышечной ткани при прогрессирующих мышечных дистрофиях в доступной литературе мы не обнаружили. цАМФ-связывающая активность протеинкиназ также не была изучена.

По-видимому, восстановление объективной картины метаболизма цАМФ при патологии возможно только при одновременном определении всех ферментов, регулирующих уровень циклического нуклеотида при различных формах миодистрофий.

Для этого в биопсийном материале, полученном от больных и здоровых людей, мы определяли активность аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, содержание цАМФ и цАМФ-связывающую способность протеинкиназ.

М е т о д и к а

Часть полученного биопсийного материала немедленно погружали в жидкий азот. Содержание цАМФ определяли описанным методом [8]. Другую часть материала гомогенизировали на холоду в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА рН 7,4. Полу-

ченный гомогенат центрифугировали при 4000—5000 об/мин при 0°C. Надосадок использовали для определения активности фосфодиэстеразы по методу, описанному Е. С. Севериным и соавт. [9].

цАМФ-связывающую способность протеинкиназ определяли в надосадке по модифицированному нами методу Кребса [10]. 1—1,5 мл надосадочной фракции диализировали против 50-кратного объема буфера гомогенизации 12—14 ч при 0°C для освобождения от цАМФ. 50 мкл диализата (50—100 мкг белка) вносили в раствор буфера гомогенизации, содержащего 150 мкл ^3H -цАМФ в различной концентрации (от $20 \cdot 10^{-12}$ до $0,3 \cdot 10^{-12}$ М). Растворы готовили методом серийных разведений. Пробы инкубировали 2 ч при 0°C и фильтровали через мембранные фильтры «Сыпор». Константы диссоциации комплекса протеинкиназа — цАМФ вычисляли по методу Лайнуивера — Берка (графики сродства).

Осадок суспендировали в 3—5 мл буфера гомогенизации и использовали для определения активности аденилатциклазы. Для этого 40—60 мкг белка мембранной фракции инкубировали 5—20 мин при 37°C в конечном объеме 150 мкл. Среда инкубации содержала: 10 мМ трис-НСl, 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ KCl, 5 мМ теофиллин, 1 мМ АТФ, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотриэтол, 20 мМ фосфоенолпируват, 5 мг на 1 мл пируваткиназы рН 7,4. Реакцию останавливали нагреванием. Пробы центрифугировали для удаления денатурированного белка при 4000—5000 об/мин, в надосадке определяли содержание цАМФ. Прирост цАМФ был линейным в течение 30 мин инкубации. Активность ферментов и концентрацию цАМФ выражали в расчете на 1 мг неколлагенового белка [4].

Определение перечисленных параметров было проведено у 23 больных. У 6 из них была установлена миопатия Дюшенна, у 10 — миопатия Эрба, у 6 — миопатия Ландузи — Дежерина. В качестве контроля использовали биопсийный материал (от 7 больных), полученный при хирургических вмешательствах, не связанных с заболеваниями мышечной системы.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, достоверного изменения базальной активности аденилатциклазы у больных с изученными формами миопатий не наблюдалось.

Обнаружено резкое угнетение степени активации фермента адреналином (в 10 раз) и NaF (в 5 раз) при миопатии Дюшенна. При миопатии Эрба и Ландузи — Дежерина существенных отклонений не выявлено.

Из табл. 2 видно, что характерным для миодистрофии Дюшенна является низкий уровень цАМФ. При других формах миопатий изменений содержания нуклеотида не выявлено.

Удельная активность фосфодиэстеразы была резко снижена у больных миопатией Дюшенна, повышена при миопатии Ландузи — Дежерина и не отличалась от нормы при миопатии Эрба.

Наибольший интерес представляют данные по изучению $K_{\text{дисс}}$ комплекса протеинкиназа — цАМФ. У больных миопатией Дюшенна на фоне снижения уровня цАМФ и активации аденилатциклазы существенного изменения сродства протеинкиназ к цАМФ обнаружено не было (см. рисунок).

Мышечная ткань больных миопатией Эрба и Ландузи — Дежерина содержала протеинкиназы с высоким сродством к цАМФ ($K_{\text{дисс}}$ равна $0,4 \cdot 10^{-8}$ М).

Как известно, имеются три классические формы прогрессирующих мышечных дистрофий — Дюшенна, Ландузи — Дежерина и Эрба. Каждая из

Таблица 1

Базальная активность и степень активации аденилатциклазы в норме и при миопатии

| Обследованные | Число обследованных | Базальный уровень аденилатциклазы, пмоль/мин на 1 мг белка | Активация аденилатциклазы, % к базальному уровню цАМФ | |
|------------------------------|---------------------|--|---|------------------------|
| | | | адреналин, 10^{-4} М | NaF, 10^{-2} М |
| Здоровые | 7 | $4,11 \pm 0,6$ | 256 ± 32 | 1000 ± 85 |
| Больные: миопатией Дюшенна | 6 | $3,02 \pm 0,3$ > 0,5 | 26 ± 10 < 0,01 | 196 ± 15 < 0,01 |
| миопатией Эрба | 10 | $4,7 \pm 0,5$ > 0,5 | 205 ± 44 > 0,5 | 966 ± 52 > 0,5 |
| миопатией Ландузи — Дежерина | 6 | $3,4 \pm 0,7$ > 0,5 | 339 ± 39 > 0,5 | 1001 ± 69 > 0,5 |

них характеризуется определенным типом наследования, возрастом больного к началу заболевания и характером течения патологического процесса. Однако поскольку молекулярные особенности патогенеза отдельных миопатий не установлены, диагностические и терапевтические мероприятия до настоящего времени проводятся с общих позиций.

Таблица 2
Содержание цАМФ, цАМФ-связывающая и фосфодиэстеразная активность в норме и при миопатии

| Обследованные | Число обследо- ванных | Уровень цАМФ, нмоль на 1 мг белка | Конс для спе- цифического свя- завания цАМФ ($\times 10^{-4}$ M) | Удельная актив- ность фосфоди- эстеразы, нмоль в 1 мин |
|--|--------------------------|---|--|---|
| Здоровые | 7 | $13,4 \pm 2,2$ | $5,5 \pm 0,5$ | $13,7 \pm 1,6$ |
| Больные миопатией Дюшенна | 6 | $4,8 \pm 1,1$ $< 0,01$ | $5,3 \pm 0,8$ $> 0,5$ | < 4 |
| Больные миопатией Эрба | 10 | $11,1 \pm 2,4$ $> 0,5$ | $0,4 \pm 0,18$ $< 0,01$ | $13,6 \pm 1,9$ $> 0,5$ |
| Больные миопатией Ланджери — Дежерина | 6 | $10,9 \pm 0,15$ $> 0,5$ | $0,42 \pm 0,15$ $< 0,01$ | $21,5 \pm 2,6$ $< 0,05$ |

Примечание. Константа диссоциации.

дионотопного метода анализа (в присутствии физиологических концентраций цАМФ) нами было отмечено значительное уменьшение активности этого энзима. В то же время K_{дисс} и Pearson [6], применяя распространенный метод определения активности с использованием субстрата в концентрации 1 мМ, отклонений в активности фосфодиэстеразы не обнаружили.

Это противоречие, вероятно, обусловлено присутствием в мышечной ткани двух типов фосфодиэстеразы [11]: первый — имеющей повышенное сродство к низким концентрациям субстрата (10^{-6} — 10^{-7} М), второй — активной лишь в присутствии высоких концентраций цАМФ, в десятки раз превышающих физиологический уровень нуклеотида в тканях. По-видимому, при этой форме миопатии снижение активности фермента происходит за счет выпадения фосфодиэстеразы первого типа.

Поскольку при миопатии Дюшенна уровень цАМФ в мышцах резко снижен, активация аденилатциклазы адреналином и NaF не выражена, а сродство протеникиназы к цАМФ не изменено, можно предположить, что увеличение содержания нуклеотида при гормональных воздействиях не превышает пороговых величин активации отдельных протеникиназ. Кребс и соавт. [10], определив K_{дисс} для цАМФ в условиях, близких к физиологическим, пришли к выводу, что при имеющихся в клетке концентрациях цАМФ, протеникиназы и белкового ингибитора протеникиназы уровень цАМФ, характерный для покоящейся мышцы ($2,5 \cdot 10^{-7}$ М), недостаточен для активации протеникиназ. Лишь при увеличении концентрации цАМФ в 10^2 — 10^3 раз происходит связывание и отделение каталитической субъединицы фермента. Возможно, что снижение активности фосфодиэстеразы у больных с этой формой миопатии носит компенсаторный характер и на ранних этапах заболевания на фоне относительно высокой активности аденилатциклазы способствует стабилизации уровня нуклеотида.

Описанные в литературе нарушения процессов фосфорилирования, проницаемости мембран, кальцийсвязывающей способности саркоплазма-

При изучении обмена циклических нуклеотидов у больных с разными формами мышечных дистрофий нами были выявлены специфические особенности патологического процесса в каждом конкретном случае.

Характерной особенностью миопатии Дюшенна было снижение уровня цАМФ, а также активности ферментов, принимающих участие в обмене нуклеотида. Базальная активность и степень активации адреналином и NaF были резко снижены, что согласуется с полученными ранее данными [4].

Что касается активности фосфодиэстеразы, то при использовании физиологических концентраций цАМФ нами было отмечено значительное уменьшение активности этого энзима. В то же время K_{дисс} и Pearson [6], применяя распространенный метод определения активности с использованием субстрата в концентрации 1 мМ, отклонений в активности фосфодиэстеразы не обнаружили.

Это противоречие, вероятно, обусловлено присутствием в мышечной ткани двух типов фосфодиэстеразы [11]: первый — имеющей повышенное сродство к низким концентрациям субстрата (10^{-6} — 10^{-7} М), второй — активной лишь в присутствии высоких концентраций цАМФ, в десятки раз превышающих физиологический уровень нуклеотида в тканях. По-видимому, при этой форме миопатии снижение активности фермента происходит за счет выпадения фосфодиэстеразы первого типа.

Поскольку при миопатии Дюшенна уровень цАМФ в мышцах резко снижен, активация аденилатциклазы адреналином и NaF не выражена, а сродство протеникиназы к цАМФ не изменено, можно предположить, что увеличение содержания нуклеотида при гормональных воздействиях не превышает пороговых величин активации отдельных протеникиназ. Кребс и соавт. [10], определив K_{дисс} для цАМФ в условиях, близких к физиологическим, пришли к выводу, что при имеющихся в клетке концентрациях цАМФ, протеникиназы и белкового ингибитора протеникиназы уровень цАМФ, характерный для покоящейся мышцы ($2,5 \cdot 10^{-7}$ М), недостаточен для активации протеникиназ. Лишь при увеличении концентрации цАМФ в 10^2 — 10^3 раз происходит связывание и отделение каталитической субъединицы фермента. Возможно, что снижение активности фосфодиэстеразы у больных с этой формой миопатии носит компенсаторный характер и на ранних этапах заболевания на фоне относительно высокой активности аденилатциклазы способствует стабилизации уровня нуклеотида.

Описанные в литературе нарушения процессов фосфорилирования, проницаемости мембран, кальцийсвязывающей способности саркоплазма-

K_{дисс} —

тического ретикулума, снижение активности фосфорилазы за счет выпадения активной формы фермента, по-видимому, являются следствием обнаруженных биохимических дефектов.

При изучении компонентов системы цАМФ у больных миопатией Эрба были получены другие результаты. Установлено, что уровень цАМФ, активность и активация аденилатциклазы гормоном и NaF остаются в пределах нормы. Полученные результаты находятся в некотором противоречии с данными Иванова и соавт. [5], которые обнаружили снижение базальной активности аденилатциклазы в 2 раза, а также снижение концентрации цАМФ при этой форме заболевания. Но поскольку содержание цАМФ определялось авторами в пересчете на 1 г сырого веса, а при миопатиях значительная часть мышечной ткани замещена соединительной и жировой с низкой концентрацией цАМФ, результаты Иванова и соавт. сопоставимы с нашими данными. Методически обосновано производить расчеты на 1 мг неколлагенового белка [4].

При изучении связывания цАМФ протеинкиназами величина $K_{дисс}$ оказалась резко сниженной (в среднем в 10 раз). В некоторых случаях сродство протеинкиназы к цАМФ превышало норму в 30 раз и более. Хотя повышение сродства фермента к субстрату неоднократно описывалось при функциональных изменениях [12], в условиях стационарной патологии (наследственные заболевания) это явление чрезвычайно редкое. Изменение сродства протеинкиназ к цАМФ при мышечной патологии обнаружено впервые.

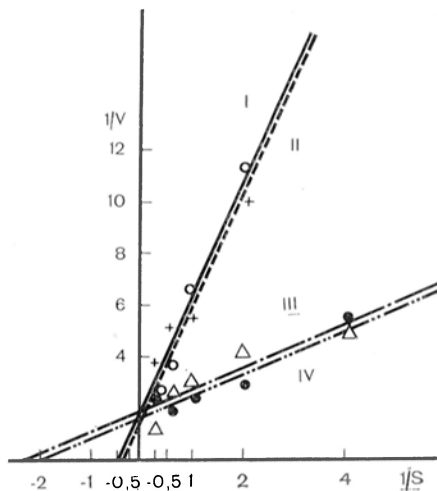
Уменьшение $K_{дисс}$ у больных миопатией Эрба, имитируя повышение концентрации цАМФ, вероятно, приводит к усилению катаболических процессов в мышцах [13]. Высказанное Кребсом предположение о концентрационном ограничении связывания цАМФ протеинкиназой при данной патологии, по-видимому, необосновано. Опыты с нагрузками адреналином косвенно подтверждают это [14]. Если при введении адреналина больным миопатией Дюшенна содержание молочной кислоты в оттекающей от мышц крови не изменялось, то у больных миопатией Эрба стимуляция гликогенолиза носила пролонгированный характер.

Из перечисленных форм миопатий наиболее доброкачественным течением отличается миопатия Ландузи — Дежерина. При изучении уровня цАМФ, активности и активации аденилатциклазы существенных отклонений от нормы не обнаружено. Как и при миопатии Эрба, цАМФ-связывающая способность протеинкиназ оказалась значительно выше нормы.

Отличительной особенностью этой формы миопатии является обнаруженное нами увеличение в 2 раза активности фосфодиэстеразы. Именно этим, очевидно, объясняется доброкачественность течения заболевания.

Полученные данные позволяют говорить о двух качественно отличных типах цАМФ-зависимых обменных процессов при мышечной патологии.

Практически полная автономность мышечной ткани у больных миопатией Дюшенна приводит к устойчивому снижению уровня цАМФ и, возможно, как следствие этого к возникновению комплекса патохимических нарушений.



Специфическое связывание цАМФ протеинкиназами в мышечной ткани больных миопатией Дюшенна (II), Эрба (III), Ландузи — Дежерина (IV) и у здоровых людей (I).

Биохимические изменения у больных миопатиями Эрба и Ландузи — Дежерина имеют противоположную направленность. Развитие патологического процесса при этих формах заболевания, по-видимому, обусловлено индивидуальными наследственными особенностями структуры протеинкиназ.

Авторы выражают благодарность зав. кафедрой биохимии Московского университета акад. АН СССР С. Е. Северину и старшему научному сотруднику В. А. Ткачуку за ценные указания и помощь в освоении методик.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаусманова - Петрусевич И. Мышечные заболевания. Варшава, 1971. — 2. Takagi A. et al. — Arch. Neurol. (Chic.), 1973, v. 38, p. 380. — 3. Lin C. H. et al. — Life Sci., 1972, v. 11, p. 355. — 4. Mawatari S. et al. — Arch. Neurol. (Chic.), 1974, v. 30, p. 96. — 5. Иванов И. И. и др. Биохимия мышц. М., 1977, с. 246. — 6. Kar C., Pearson M. — Clin. chim. Acta, 1974, v. 50, p. 435. — 7. Canal N. et al. — J. Neurol., 1975, v. 208, p. 259. — 8. Gilman A. G. — Advanc. Cyclic Nucl. Res., 1972, v. 2, p. 9. — 9. Северин Е. С. и др. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 384. — 10. Beavo J. A., Bechtel P. J., Krebs E. G. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 3580. — 11. Russell T. R. et al. — Ibid., 1972, v. 69, p. 1791. — 12. Минеева - Вялых М. Ф., Луценко В. К., Кудрин В. С. и др. — Бюлл. Экспер. биол., 1977, № 5, с. 543. — 13. Tappel A. L. et al. — Arch. Biochem., 1962, v. 96, p. 340. — 14. Muscle Diseases. Proceedings of an International congress. Ed. J. N. Walton, N. Canal, G. Scarlato. Amsterdam, 1970.

Поступила 12/IX 1977 г.

CHARACTERISTICS OF CYCLIC 3',5'-AMP TURNOVER IN PATIENTS WITH PROGRESSIVE MUSCULAR ATROPHY

A. P. Khokhlov, V. K. Malakhovsky

Medico-Genetic Department, Central Research Laboratory, I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

Concentration of cyclic AMP was distinctly decreased in muscular tissue of patients with Dushenn's myodystrophy. Simultaneously, in patients with the myopathy basal activity of adenylate cyclase as well as activation of the enzyme by adrenaline and sodium fluoride were decreased. As a compensation, activity of phosphodiesterase was also decreased. Content of cAMP, activity and activation of adenylate cyclase were similar to normal state in patients with Erb's and Landuzi—Dejerin's myopathies; activity of phosphodiesterase was increased in the latter impairment. Dissociation constant for binding of cAMP by protein kinases was more than 10-fold decreased in patients with these types of myopathy.

УДК 612.82.015.1:577.152.311.042.2

Л. Певзнер, Е. К. Балашова, Э. Э. Круглова, В. И. Розенгарт, О. Е. Шерстобитов, А. А. Абдувахабов

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В МОЗГЕ КРЫС

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград, Институт биоорганической химии АН Узбекской ССР, Ташкент

Исследовали гидрофобность (коэффициент распределения в системе гексан : вода) и содержание в субклеточных фракциях мозга крыс фосфорорганических ингибиторов холинэстеразы строения $RO(CH_3)_3P(O)SC_2H_4SC_2H_5$. При увеличении *O*-алкильного радикала от C_2H_5 до C_7H_{15} коэффициент увеличивается от 1,0 до 500, а относительное содержание в мозге фосфорорганических ингибиторов, экстрагируемых хлороформом, уменьшается. С увеличением гидрофобности резко снижается относительное содержание фосфорорганических ингибиторов в надмембранной фракции, при этом более гидрофобные соединения в относительно большем количестве содержатся во фракциях ядер и митохондрий. У двух более гидрофобных соединений ($R = C_4H_9$ и $R = C_7H_{15}$) отсутствовала способность к дополнительному угнетению собственной холинэстеразы мозга в результате инкубации с гомогенатом при 37°C, что свидетельствует о существенном уменьшении в исследованном ряду содержания свободного фосфорорганического ингибитора по отношению к экстрагируемому хлороформом его количеству.

В изучении механизма действия фосфорорганических ингибиторов (ФОИ) холинэстеразы важное место принадлежит исследованию ФОИ в организме животных, в частности характера их распределения по органам и тканям. Получение информации по этому вопросу тесно связано с необходимостью располагать адекватными методами определения низких концентраций ФОИ в биологическом материале. В настоящее время такие методы разработаны. Они основаны на разных принципах, и с их помощью получено достаточно большое число данных, частично обобщенных в ряде обзоров и монографий [1—4].

Анализ имеющейся литературы показывает, что не все аспекты распределения ФОИ изучены с необходимой полнотой. В частности, почти совершенно не исследованы внутриклеточное распределение и способность ФОИ накапливаться в отдельных субклеточных фракциях. По этому вопросу известны лишь единичные работы. В опытах с введением крысам ^{32}P -диизопропилфторфосфата было показано, что через 60 мин наибольшая радиоактивность обнаруживается в микросомах печени, а наименьшая — в митохондриях [5]. О способности ФОИ проникать в субклеточные частицы свидетельствует угнетение активности холинэстеразы в митохондриях нервных клеток крыс после введения им большой дозы дихлофоса [6]. И. Г. Щербак [4] показал, что вещество ЛГ-63 — производное метилфосфоновой кислоты — более или менее равномерно распределяется по субклеточным фракциям мозга крыс. Более детальное изучение внутриклеточного распределения ФОИ после их введения животному представляет не только теоретический интерес, но имеет и большое практическое значение. Знание закономерностей такого распределения, особенно зависимости характера распределения от структуры и физико-химических свойств ФОИ, позволит глубже понять природу депонирования ФОИ в организме и характер их метаболических превращений, так как ферменты, катализирующие метаболизм ФОИ, имеют совершенно определенную и, как правило, различную субклеточную локализацию.

Задача настоящей работы состояла в изучении субклеточного распределения в мозге крыс трех ФОИ, близких по строению, и в сопоставлении характера этого распределения с физико-химическими свойствами ФОИ и особенностями их депонирования в ткани мозга.

М е т о д и к а

Исследованы три ФОИ строения $\text{RO}(\text{CH}_2)_n\text{P}(\text{O})\text{SC}_2\text{H}_4\text{SC}_2\text{H}_5$, где $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$ (ГД(О)), $\text{R}=\text{C}_4\text{H}_9$ (ГА-59) и $\text{R}=\text{C}_7\text{H}_{15}$ (ГА-73). Синтез и антихолинэстеразные свойства этих ФОИ описаны ранее [7]. Гидрофобность соединений оценивали по величине коэффициента распределения в системе гексан : вода [8]. Опыты ставили на крысах-самцах линии Вистар массой 180—220 г. ФОИ вводили внутримышечно в эквитоксических дозах, близких к смертельным. Животных декапитировали через 15 мин после введения им ФОИ при четко выраженных симптомах отравления. Для одного опыта объединяли мозг нескольких крыс. Субклеточные фракции получали дифференциальным центрифугированием по методу Эйхберга и соавт. [9]. Навеску ткани мозга гомогенизировали в 10-кратном количестве 0,32 М сахарозы, приготовленной на трис-буфере рН 7,2—7,4 в стеклянном гомогенизаторе при 800 об/мин.

Гомогенат в количестве 10 мл, содержащий 1 г ткани, центрифугировали 10 мин при 1000 g, осадок промывали первоначальным объемом сахарозы и снова центрифугировали 10 мин при 1000 g. Промытый осадок представлял собой фракцию ядер. Кроме ядер, она содержала обрывки ткани и кровеносных сосудов.

Объединенные надосадочные жидкости центрифугировали 20 мин при 11 700 g. Осадок промывали первоначальным объемом сахарозы и повторно центрифугировали 30 мин при 11 700 g. Полученный осадок обозначали как фракцию митохондрий. По существу она являлась общей митохондриальной фракцией и содержала, кроме митохондрий, миелин и синапсомы. Надосадочную жидкость центрифугировали 60 мин при 170 000 g, в результате чего получали микросомы и надосадочную жидкость — надмикросомальную фракцию.

Содержание свободного ингибитора в гомогенатах ткани мозга и субклеточных фракциях определяли разработанным нами хлороформным методом [10]. Сущность метода заключается в экстракции ингибитора хлороформом, удалении растворителя выпариванием (при этом ингибитор переходит в водную фазу) и последующем определении ингибитора в водной фазе по его способности угнетать стандартную холинэстеразу. В качестве стандарта

использовали препарат растворимой ацетилхолинэстеразы из эритроцитов крови человека (АХЭЧ) производства Пермского научно-исследовательского института вакцин и сывороток. Активность холинэстеразы определяли методом Хестрина [11].

В гомогенатах свободный ингибитор определяли по описанной методике. Осадки субклеточных фракций (ядер, митохондрий и микросом) предварительно ресуспендировали в 4,0 мл 0,32 М сахарозы и определяли содержание ингибитора. Концентрацию ингибитора в надмикросомальной растворимой фракции определяли непосредственно по степени угнетения ею стандартной АХЭЧ.

Содержание свободного ингибитора выражали в наномолях ФОИ на 1 г сырого веса ткани мозга, а для субклеточных фракций, кроме того, и в процентах от содержания ФОИ в исходном гомогенате. Так как вводимые дозы для разных ФОИ были различными, то для сравнения ингибиторов между собой содержание ингибитора в мозге выражали также в процентах от равномерного распределения, принимая во внимание, что при равномерном распределении концентрация ингибитора во всех тканях должна быть одинаковой и равной введенной дозе.

Для характеристики депонирования активного ингибитора в мозге использовали описанный ранее [10] специальный прием, названный нами методом «доугнетения» холинэстеразы мозга. Он состоял в следующем. Мозг, извлеченный после введения ФОИ, гомогенизировали в замороженном виде. Часть гомогената оставляли на холоду, а другую часть инкубировали в течение 2 ч при 37°C. По истечении этого срока определяли активность холинэстеразы. Основанием для такой постановки опыта служил известный факт, что при 37°C торможение холинэстеразы прогрессирует во времени, а при 0°C практически этого не происходит. Поэтому степень «доугнетения», наблюдаемого при 37°C, должна отражать количество «совершенно свободного» ФОИ, способного реагировать с собственной холинэстеразой. Ранее было показано, что величина «доугнетения» в большой мере зависит от структуры ФОИ [10, 12].

Результаты и обсуждение

Исследованные нами ФОИ весьма существенно отличались друг от друга по токсичности, поэтому вводимая доза также была различной. Как видно из табл. 1, с удлинением алкильного радикала, связанного с атомом фосфора через кислород, значительно возрастала гидрофобность соединений, оцениваемая по величине коэффициента распределения в системе гексан : вода. С ростом гидрофобности относительное содержание ФОИ в мозге

Т а б л и ц а 1

Содержание свободных ФОИ в гомогенатах мозга крыс через 15 мин после внутримышечного введения

| Ингибитор | | Коэффициент распределения в системе гексан : вода | Введенная доза, нмоль/г | Содержание ФОИ | | Количество ФОИ, попавшее на «доугнетение», % от содержания свободного ФОИ |
|-----------|--------------------------------|---|-------------------------|----------------|---------------------------------|---|
| шифр | R | | | нмоль/г | % от равномерного распределения | |
| ГД-7 | C ₂ H ₅ | 1* | 5 | 1,2±0,04 | 24,0 | 30* |
| ГА-59 | C ₄ H ₉ | 33* | 0,45 | 0,024±0,001 | 5,4 | 0* |
| ГА-73 | C ₇ H ₁₅ | 500 | 200 | 0,25±0,02 | 0,12 | 0 |

* По данным [10].

(в процентах от равномерного распределения) резко снижалось. Это легко объяснить тем, что высокогидрофобные ФОИ, как было показано нами ранее [8], сорбируются на поверхности эндотелия капилляров и при внутримышечном введении накапливаются в легких, благодаря чему в меньшем количестве попадают в мозг. У двух более гидрофобных соединений — ГА-59 и ГА-73 — отсутствовал и феномен «доугнетения», т. е. в мозге эти соединения не содержались в таком «совершенно свободном» виде, в каком они могли бы непосредственно взаимодействовать с собственной холинэстеразой. Правда, этот последний факт (отсутствие «доугнетения») нельзя безоговорочно объяснить гидрофобностью веществ, поскольку ранее [10] было показано, что ингибитор ГА-71, имеющий строение C₃H₇O(CH₃)P(O)SC₆H₁₃ и оказав-

шийся более гидрофобным, чем ГА-59 (коэффициент распределения в системе гексан : вода равен 66), отчетливо «доугнетал» холинэстеразу. Вероятно, способность к «доугнетению» зависит не только от суммарной гидрофобности соединений, но и от особенностей их строения.

Распределение ФОИ по субклеточным фракциям мозга представлено в табл. 2. Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что с увеличением гидрофобности резко снижается относительное содержание ФОИ в надмембранной фракции. Это не удивительно, так как гидрофобные ФОИ легче сорбируются на липофильных поверхностях и хуже растворяются в воде и водных растворах. Соответственно этому более гидрофобные ФОИ в относительно большем количестве содержатся во фракции ядер, куда, кроме ядер, входят обрывки клеток и наиболее крупные синапсомы, а также во фракции митохондрий.

Следует обратить внимание на уменьшение суммарного относительного содержания ФОИ в субклеточных фракциях (см. последнюю графу табл. 2) с увеличением гидрофобности соединений. Этот факт означает, что в ходе фракционирования гидрофобные ФОИ утрачиваются быстрее, чем менее гидрофобные. Трудно сказать, можно ли это связать с ферментативным разрушением. Вообще говоря, ФОИ этого типа строения относятся к медленно метаболизирующим [4]. Однако мы не располагаем точными данными о том, в какой мере скорость метаболического разрушения соединений этого ряда зависит от их структуры. Если такая зависимость существует, то, учитывая длительность процедуры фракционирования, нельзя исключить и эту возможность.

Из сопоставления данных табл. 1 и 2 видно, что способностью к «доугнетению» обладает только один ингибитор — вещество ГД-7, содержание которого в надмембранной фракции как в абсолютном, так и в относительном выражении является максимальным. Поскольку именно в этой фракции находится растворенная часть ФОИ, можно думать, что как раз эта часть и обеспечивает «доугнетение» собственной холинэстеразы.

Следует отметить, что по условиям методики в надмембранной фракции определяется только «совершенно свободный» ингибитор, так как его концентрация оценивается по способности этой фракции прямо ингибировать стандартную холинэстеразу без предварительного экстрагирования хлороформом. Выявление в данной фракции (см. табл. 2)

Таблица 2

Содержание свободных ФОИ в субклеточных фракциях мозга крыс через 15 мин после введения

| ФОИ | Ядра | | Митохондрии | | Микросомы | | Надмембранная фракция | | Всего в субклеточных фракциях, % от содержания в гомогенате |
|-------|--------------|------|---------------|------|--------------|------|-----------------------|------|---|
| | нмоль/г | % | нмоль/г | % | нмоль/г | % | нмоль/г | % | |
| ГД-7 | 0,15±0,01 | 12,5 | 0,083±0,001 | 6,9 | 0,17±0,01 | 14,2 | 0,8±0,04 | 66,1 | 99,7 |
| ГА-59 | 0,005±0,0002 | 20,8 | 0,0058±0,0001 | 24,2 | 0,005±0,0002 | 20,8 | 0,006±0,0002 | 25,0 | 90,8 |
| ГА-73 | 0,095±0,01 | 38,0 | 0,064±0,003 | 25,6 | 0,037±0,003 | 14,8 | 0,021±0,001 | 8,4 | 86,8 |

Примечание. Содержание ФОИ в каждой фракции выражено в абсолютных цифрах в пересчете на 1 г ткани мозга и в процентах от содержания ФОИ в гомогенате мозга.

веществ ГА-59 и ГА-73, хотя и в сравнительно небольшом количестве, позволяет заключить, что и они теоретически должны обладать способностью к «доугнетению», однако фактически этого не наблюдается (см. табл. 1). Объяснить это противоречие предположительно можно тем, что в ходе фракционирования, основанного на дифференциальном центрифугировании, происходит частичное освобождение ФОИ из рыхлосвязанного состояния. Поэтому может оказаться, что в исходном гомогенате «совершенно свободный» ингибитор отсутствует, а в надмикросомальной (растворимой) фракции он обнаруживается вследствие фракционирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков С. Н., Розенгарт В. И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Л., 1964. — 2. О'Брайн Р. Ф. Токсичные эфиры кислот фосфора. М., 1964. — 3. Matsuura F. Toxicology of Insecticides. New York, 1975. — 4. Щербак И. Г. Распределение и метаболизм токсичных фосфорорганических соединений в животном организме. Дис. докт. Л., 1974. — 5. Agrop G., Ramachandran V. Y. — Acta physiol. scand., 1964, v. 60, p. 95. — 6. Дишовски Х. Д. Экспериментальные исследования механизма действия некоторых реактиваторов холинэстеразы при отравлении диметилдихлорвинилфосфатом. Дис. канд. Киев, 1971. — 7. Кабачник М. И. и др. — Успехи химии, 1970, т. 39, с. 1050. — 8. Балашова Е. К. и др. — Укр. біохім. ж., 1974, т. 46, с. 312. — 9. Eichberg J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C. — Biochem. J., 1964, v. 92, p. 91. — 10. Балашова Е. К. и др. — Укр. біохім. ж., 1976, т. 48, с. 460. — 11. Hestrin S. — J. biol. Chem., 1949, v. 180, p. 249. — 12. Балашова Е. К. и др. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1975, т. 10, с. 91.

Поступила 12/IX 1977 г.

INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF ORGANOPHOSPHOROUS INHIBITORS OF CHOLINESTERASE IN RAT BRAIN

D. L. Pevzner, E. K. Balashova, E. E. Kruglova, V. I. Rozengart, O. E. Sherstobitov, A. A. Abduvakhabov

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Content of organophosphorous inhibitors (with the structure $RO/CH_2/P/O/SC_2H_4SC_2H_5$) of cholinesterase as well as their hydrophobic properties (distribution coefficient in hexan/water system) were studied in subcellular fractions of rat brain. Relative content of organophosphorous inhibitors was distinctly decreased in supermicrosomal fraction with increase of hydrophobic properties of the fraction. Nuclear and mitochondrial fractions contained the more hydrophobic substances in relatively higher amount. When homogenate of supermicrosomal fraction was incubated at 37°, own brain cholinesterase was not depressed by organophosphorous inhibitors, containing in the fraction at low concentration. The phenomenon exhibits that content of free organophosphorous inhibitors is distinctly lower in the subcellular fractions studied than amount of the inhibitors, extracted with chloroform.

УДК 612.822.1:612.262].014.46:615.357.453]-06:612.273.1

Т. Т. Подвигина, Г. В. Трошихин

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРОКСИИ В СОЧЕТАНИИ С ВВЕДЕНИЕМ ГИДРОКОРТИЗОНА НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА КРЫС

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Экспонирование крыс в кислороде под давлением 3 кгс/см² в течение 2 ч приводило к снижению фосфорилирующего дыхания, дыхательного контроля, отношения АДФ/О и увеличению времени фосфорилирования в митохондриях коры мозга; в плазме крови наблюдалось повышение концентрации 11-оксикортикостероидов. Введение гидрокортизона за 1 ч до помещения животных в камеру тормозило реакцию коры надпочечников на применяемое воздействие; при этом изученные показатели функционирования митохондрий были близки к норме.

Оксигенотерапия нашла широкое применение в клинической практике, однако возможное при этом побочное действие кислорода исследовано недостаточно. В предыдущей работе [1] было показано, что пребывание крыс в течение 4—5 ч в чистом кислороде при атмосферном давлении приводит к снижению потребления кислорода и неорганического фосфата митохондриями мозга. В данной работе изучали показатели функционирования митохондрий в условиях гипербарической оксигенации, близких к тем, которые применяются в клинической практике [2]. Кроме того, в этих условиях исследовали влияние кортикостероидных гормонов, роль которых при гипероксии остается неясной. Известно, что кортикостероиды, секретируемые которых усиливается при действии различных стрессорных факторов, повышает адаптационные возможности организма. Однако некоторые авторы обнаружили усугубляющий эффект кортикостероидов на последствия кислородного отравления [3, 4]. Так как литературные данные по этому вопросу очень немногочисленны и противоречивы, любая попытка осветить этот вопрос представляется целесообразной.

Методика

Опыты поставлены на 80 белых крысах-самцах линии Вистар масса 170—200 г. Животных экспонировали в барокамере, заполненной кислородом под давлением 2 кгс/см² в течение 1 ч и 3 кгс/см² в течение 2 ч. Одной группе животных за 1 ч до помещения в камеру вводили гидрокортизон ацетат («Гедеон фирма Рихтер», Венгрия) в дозе 1 мг на 100 г, остальным животным — физиологический раствор. После окончания сеанса гипероксии крыс декапитировали, собирали кровь для определения кортикостероидов, быстро извлекали мозг и помещали на холод. Митохондрии из коры головного мозга выделяли общепринятыми методами в 0,25 М сахарозе, содержащей 0,001 М ЭДТА. Параметры, характеризующие функциональное состояние митохондрий, регистрировали на полярографе LP.7 с помощью закрытого платинового электрода при 37°C. Среда инкубации содержала 170 мМ сахарозу, 0,6 мМ ЭДТА, 35 мМ KCl, 7 мМ K₂HPO₄, 15 мМ трис-HCl pH 7,4. В качестве субстрата использовали пируват с малатом (соответственно 5 и 1 мМ). Величину дыхательного контроля и отношение АДФ/О рассчитывали по методике, предложенной Чансом [5]. Содержание кортикостероидов в крови определяли флюориметрическим методом Ван-дер-Виса в модификации Шалапиной и Панова [6]. Содержание белка определяли методом Лоури и соавт. [7].

Результаты и обсуждения

Пребывание крыс в атмосфере кислорода под давлением 2 кгс/см² в течение 1 ч не вызвало значительных изменений изучаемых показателей функционирования митохондрий. В этих условиях можно отметить лишь увеличение времени фосфорилирования (на 28%); некоторое снижение коэффициента АДФ/О оказалось недостоверным (см. таблицу).

Другую группу крыс выдерживали в камере в течение 2 часов при давлении кислорода 3 кгс/см². Гипероксия при данном режиме вызывала достоверное снижение скорости дыхания митохондрий, стимулируемого АДФ (состояние 3, по Чансу), что привело к снижению дыхательного контроля (см. таблицу). Кроме того, наблюдалось увеличение времени фосфорилирования АДФ и количества потребляемого на фосфорилирование кислорода, что обусловило снижение коэффициента АДФ/О. Скорость дыхания до добавления АДФ (V_0), после ее израсходования ($V_{\text{АДФ}}$) и после добавления 2,4-ДНФ не изменялась (рис. 1). Это свидетельствует о том, что влияние кислорода связано с энергетической регуляцией дыхания, а не с ингибированием транспорта электронов. Сходные изменения обнаружены другими авторами в митохондриях печени *in vitro* при повышении парциального давления кислорода в инкубационной среде [8], что может свидетельствовать о прямом действии кислорода на дыхательную цепь.

Однако в целом организме влияние кислорода может определяться как прямым его действием, так и опосредованным другими факторами, например, гормональным воздействием. На это указывают результаты наших опытов по определению содержания 11-оксикортикостероидов в крови. Было

показано, что пребывание крыс в камере с повышенным давлением кислорода увеличивало содержание этих гормонов при первом режиме гипероксии (2 кгс/см² в течение 1 ч) на 60%, при втором режиме (3 кгс/см² в течение 2 ч) — на 120% (рис. 2). Эти факты наряду с некоторыми данными литературы [9, 10] свидетельствуют о том, что применяемое воздействие вызывает у крыс стрессорную реакцию, характерным признаком которой является повышение содержания кортикостероидных гормонов в крови.

Интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий коры головного мозга крыс при гипероксии и введении гидрокортизона

| Условия опыта | АДФ, ммкато м О в 1 мин на 1 мг белка | Дыхательный контроль (по Чансу) | АДФ/О | Время, мин |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------|------------|
| 2 кгс/см ² в течение 1 ч: | | | | |
| контроль | 35,7±1,16 | 3,3±0,08 | 4,2±0,18 | 0,89±0,040 |
| гипероксия | 35,0±1,12 | 3,4±0,10 | 3,8±0,16 | 1,13±0,081 |
| гипероксия + гидрокортизон | 34,4±1,10 | 3,4±0,09 | 4,0±0,16 | 1,0±0,073 |
| 3 кгс/см ² в течение 2 ч: | | | | |
| контроль | 35,0±1,06 | 3,3±0,08 | 4,2±0,17 | 0,88±0,034 |
| гипероксия | 31,4±0,64 | 2,8±0,15 | 3,7±0,15 | 1,08±0,077 |
| гипероксия + гидрокортизон | 35,0±1,30 | 3,1±0,14 | 4,1±0,19 | 0,92±0,064 |

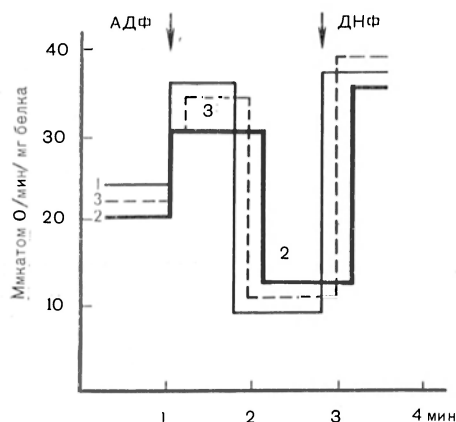


Рис. 1. Дыхание митохондрий мозга крыс в различных метаболических состояниях после действия гипероксии и введения гидрокортизона.

1 — контроль; 2 — действие повышенного давления кислорода (3 кгс/см² в течение 2 ч); 3 — гипероксия + гидрокортизон (1 мг на 100 г массы тела за 1 ч до помещения животных в камеру).

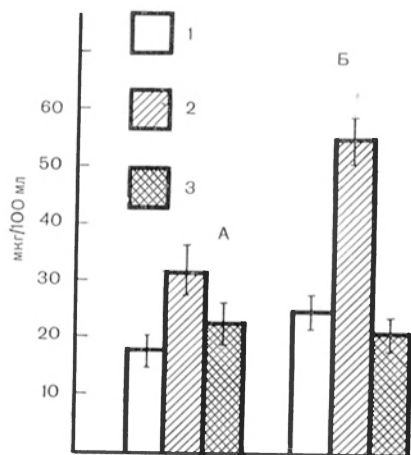


Рис. 2. Концентрация 11-оксикортикостероидов в плазме крови крыс после действия гипероксии и введения гидрокортизона.

А — первый режим гипероксии — 2 кгс/см² в течение 2 ч; Б — второй режим гипероксии — 3 кгс/см² в течение 2 ч. 1 — контроль; 2 — действие повышенного давления кислорода; 3 — гипероксия + гидрокортизон (1 мг на 100 г массы тела за 1 ч до помещения животных в камеру).

У крыс с предварительным введением гидрокортизона уровень 11-оксикортикостероидов в крови был значительно ниже по сравнению с таковым у животных, подвергавшихся действию гипероксии без введения гормона. Особенно четко эти различия проявились во второй серии опытов (см. рис. 2). Наблюдаемое снижение содержания гормона можно объяснить тем, что введенный гидрокортизон в момент забоя животных (3 ч после введения) уже удален из кровяного русла, а собственная продукция кортико-

стероидов в ответ на стресс несколько заторможена по механизму обратной связи. У этой группы животных наблюдалось повышение дыхания митохондрий мозга в активном состоянии ($V_{\text{АДФ}}$), в результате чего значения дыхательного контроля и отношения АДФ/О оказались близкими к норме. Под влиянием введения гормона сократилось и время фосфорилирования в обеих сериях опытов (см. таблицу). Наблюдаемая корреляция между уровнем кортикостероидов в крови и изменениями показателей функционирования митохондрий в наших опытах позволяет предположить, что эти гормоны могут усугублять действие кислорода на митохондриальные процессы. Это тем более кажется возможным, если учесть наши предыдущие данные [11, 12], свидетельствующие об ингибирующем эффекте самих кортикостероидов на интенсивность дыхания и фосфорилирования в митохондриях мозга крыс, который проявляется как при введении гормонов интактным крысам, так и при добавлении их в инкубационную среду.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трошихин Г. В., Подвигина Т. Т. — В кн.: Оксидотические и аноксидотические процессы при экспериментальной и клинической патологии Киев, 1975, с. 212—213. — 2. Шик Л. Л., Султанов Т. А. (ред.) Лечение повышенным давлением кислорода. М., 1968. — 3. Gerschman R., Gilbert D. Z. et al. — Am. J. Physiol., 1954, v. 178, p. 346—350. — 4. Гуцу Н. В., Нигуляну В. И. — В кн.: Повышение резистентности организма к экстремальным воздействиям. Кишинев, 1973, с. 33—36. — 5. Чанс Б. — В кн.: Регуляция клеточного обмена. М., 1962, с. 111—152. — 6. Панов А. Н., Шалыпина В. Г. — Пробл. эндокринологии, 1968, № 2, с. 75—77. — 7. Lowry D. H., Rosebrough N. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275. — 8. Елисеева С. В., Котова Е. Н., Кондрашова М. Н. — В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., 1973, с. 146—153. — 9. Демуров Е. А., Михайлов Ю. Е., Шимкевич Л. Л. и др. — В кн.: Гипербарическая оксигенация. М., 1975, с. 242—244. — 10. Трошихин Г. В., Шалыпина В. Г. — Физиол. ж. СССР, 1970, т. 56, с. 119—122. — 11. Подвигина Т. Т. — Бюлл. exper. биол., 1973, № 7, с. 40—43. — 12. Подвигина Т. Т. — Укр. биохим. ж., 1974, т. 46, с. 763—767.

Поступила 21/X 1977 г.

SIMULTANEOUS EFFECT OF HYPEROXIA AND HYDROCORTISONE ADMINISTRATION ON MITOCHONDRIAL RESPIRATION IN RAT BRAIN

T. T. Podvigina, G. V. Troshikhin

I. P. Pavlov Institute of Physiology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

After exposure of rats in oxygen atmosphere under pressure of 3 kgs/cm² within 2 hrs phosphorylating respiration, respiratory control and the ratio ADP/O were decreased, while time of phosphorylation was increased in mitochondria of brain cortex. Content of 11-hydroxycorticosteroids was increased in blood plasma. Reaction of adrenal cortex to hyperbaric oxygenation was inhibited, if hydrocortisone was administered into animals within 1 hr before the treatment; in this case the patterns of mitochondrial function studied were similar to normal values.

УДК 612.744.14.015.36-06:612.766.2

А. Е. Антипенко, Ю. А. Бубеев, Б. Ф. Коровкин, Н. П. Михалева

СИСТЕМА цАМФ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

При длительной гипокинезии (70—75 сут) и в период реадaptации в мышечной ткани белых крыс были изучены компоненты системы цАМФ. Установлено, что в начальный период ограничения подвижности (особенно на 5-е сутки) уровень цАМФ, а также активность аденилатциклазы и фосфодиэстеразы в мышечной ткани повышены. В период так называемой адаптации (на 24—37-е сутки) содержание цАМФ и активность обоих ферментов практически не отличались от контроля. На 70-е сутки эксперимента отмечалось резкое снижение уровня цАМФ, повышение активности фосфоди-

Содержание цАМФ и активность аденилатциклазы и фосфодиэстеразы в мышечной ткани при гипокинезии и в период реадaptации

| Вещества | Контроль | Гипокинезия | | | | | | | | | | Реадаптация | |
|--|------------|-------------|---------------------|----|---------------------|----|---------------------|----|---------------------|----|---------------------|-------------|---------------------|
| | | n | 2-е сутки | n | 5-е сутки | n | 24-е сутки | n | 37-е сутки | n | 70-е сутки | n | 7-е сутки |
| цАМФ, пмоль на 1 г ткани <i>P</i> | 368,6±38,2 | 26 | 489,2±71,4 >0,05 | 12 | 692,8±53,1 <0,01 | 15 | 366,8±53,1 >0,50 | 12 | 393,2±36,2 >0,30 | 12 | 144,0±31,2 <0,01 | 15 | 376,1±62,0 >0,40 |
| Аденилатциклаза, пмоль на 1 мг белка в 1 мин <i>P</i> | 7,81±0,55 | 24 | 11,61±0,72 <0,01 | 12 | 18,04±2,60 <0,01 | 14 | 9,76±1,82 >0,10 | 12 | 8,74±1,60 >0,30 | 10 | 10,06±1,18 >0,05 | 15 | 9,52±0,95 >0,05 |
| Фосфодиэстераза, пмоль на 1 мг белка в 1 мин <i>P</i> | 751,2±58,7 | 15 | 841,2±46,4 >0,10 | 10 | 951,0±48,5 <0,05 | 10 | 838,7±61,7 >0,10 | 10 | 791,1±62,5 >0,30 | 10 | 890,1±14,2 <0,05 | 10 | 806,2±83,5 >0,30 |

Примечание. *P* рассчитано по отношению к контролю.

эстеразы и снижение стимулирующего эффекта адреналина на активность аденилатциклазы. В период реадaptации происходила заметная нормализация исследованных показателей.

Неблагоприятное влияние гипокинезии (ограничение подвижности) на организм человека и животных давно известно клиницистам и биологам. Длительное ограничение двигательной активности вызывает уменьшение массы тела, что, по-видимому, в значительной мере связано со снижением общей массы скелетных мышц. При гипокинезии развивается дистрофия части мышечных волокон, изменяются активность ферментов и фракционный состав мышечных белков, отмечаются сдвиги в углеводном обмене [1, 2, 5]. Таким образом, состояние длительной гипокинезии сопровождается серьезными нарушениями обменных процессов в мышечной ткани. В последние годы отчетливо показано, что в регуляции метаболизма клетки важная роль принадлежит компонентам системы цАМФ [6]. Однако в литературе практически нет данных о содержании цАМФ и активности аденилатциклазы и фосфодиэстеразы в мышечной ткани при гипокинезии. В связи с этим нами была поставлена задача изучить состояние системы цАМФ в скелетной мускулатуре белых крыс в разные сроки гипокинезии и в период реадaptации.

Методика

Опыты проводили на нелинейных белых крысах. Состояние гипокинезии вызывали помещением животных в специальные станки-домики, где подвижность их была ограничена. Исследованию подвергали мышечную ткань (*m. gastrochemius*) в разные сроки гипокинезии (2, 5, 24, 37 и 70-й дни) и на 7-е сутки реадaptации. В качестве контроля служили белые крысы, содержащиеся в обычных условиях вивария. Содержание цАМФ определяли радиоиммунологическим методом с использованием набора готовых реактивов фирмы «Amersham» (Англия), активность аденилатциклазы и фосфодиэстеразы исследовали изотопным методом с использованием в качестве субстратов ^3H -АТФ и ^3H -цАМФ соответственно [4, 7].

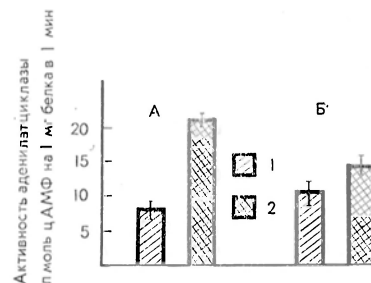
Результаты и обсуждение

Результаты определения компонентов системы цАМФ в мышечной ткани белых крыс при длительной гипокинезии и в период реадaptации представлены в таблице.

Как видно из таблицы, на 2—5-е сутки гипокинезии активность аденилатциклазы была повышена в среднем в 2,3 раза, активность фосфодиэстеразы — в 1,2 раза, уровень цАМФ — в 1,9 раза по сравнению с контролем. К 24—37-м суткам гипокинезии содержание всех исследованных компонентов постепенно уменьшилось, достигая практически нормальных величин. На 70-е сутки гипокинезии уровень цАМФ значительно снизился, статистически достоверно повысилась активность фосфодиэстеразы — фермента, разрушающего цАМФ, и практически не изменилась активность аденилатциклазы. В период реадaptации (в таблице приведены данные на 7-е сутки) уровень цАМФ и активность аденилатциклазы и фосфодиэстеразы фактически нормализовались.

Анализируя полученные данные, нетрудно видеть, что в первые сутки гипокинезии (особенно на 5-й день) отмечается активация системы цАМФ, затем наступает период «адаптации» (24—37-е сутки) и содержание компонентов системы цАМФ в мышечной ткани находится в пределах нормы. На 70-е сутки гипокинезии наблюдается уже период как бы истощения системы цАМФ (уровень цАМФ составлял лишь 39% по сравнению с нормой). Следует заметить, что резкое снижение содержания цАМФ в мышечной ткани на 70-е сутки гипокинезии отмечалось на фоне нормальных величин активности аденилатциклазы — фермента, участвующего в синтезе цАМФ.

Данный факт заставил нас исследовать так называемую стимулируемую активность аденилатциклазы в период длительной гипокинезии. Известно, что в норме при добавлении к гомогенатам тканей адреналина активность аденилатциклазы резко повышается [3]. Проведенные нами исследования показали (см. рисунок), что добавление адреналина в концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ М к гомогенатам мышечной ткани контрольных крыс приводило к увеличению активности аденилатциклазы в 2,9 раза ($P < 0,01$), тогда как в гомогенатах мышц подопытных крыс (70-е сутки гипокинезии) в присутствии адреналина активность данного фермента увеличивалась лишь в 1,4 раза ($P < 0,05$). Следовательно, при длительной гипокинезии наступают качественные сдвиги в аденилатциклазном комплексе. Есть основания предполагать, что дальнейшие исследования в указанном направлении помогут раскрыть истинные механизмы нарушений метаболизма мышечной ткани при длительной гипокинезии и наметить пути их коррекции.



Влияние адреналина на активность аденилатциклазы в гомогенатах мышечной ткани в норме и при длительной гипокинезии.

1 — без добавления адреналина; 2 — в присутствии адреналина ($3 \cdot 10^{-4}$ М).
А — контроль; Б — гипокинезия (70 сут).

ЛИТЕРАТУРА

1. Жданова А. Г. — Арх. анат., 1965, № 12, с. 29.
2. Михалева и др. — Космическая биол., 1970, № 2, с. 42.
3. Перцева М. Н. — Успехи совр. биол., 1976, № 1, (4), с. 16.
4. Ткачук В. А. и др. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 1704.
5. Чаговец Р. В. — Труды Киевск. ин-та физкультуры, 1957, т. 2, с. 105.
6. Sutherland E. W. — Science, 1972, v. 177, p. 401.
7. Drummond G. I., Duncan L. — J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 976.

Поступила 27/X 1977 г.

Constituents of cAMP system were studied in prolonged hypokinesia (70—75 days) and within the period of readaptation of muscular tissue in rats. Content of cAMP as well as activities of adenylate cyclase and phosphodiesterase were increased in muscles at the initial period of limited mobility (especially, within the first 5 days). Within the period of so-called «adaptation» (during the first 24—37 days) content of cAMP and activity of both enzymes were practically similar to control values. Distinct decrease in cAMP content, activation of phosphodiesterase and decrease in stimulating effect of adrenaline on adenylate cyclase activity were observed within the first 70 days of the experiment. Pronounced normalization of the patterns studied occurred within the period of readaptation.

УДК 616-006.6-008.931:577.152.361]-092.4

Б. З. Симхович

АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛЦИКЛАЗЫ В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА IN VITRO

Институт органического синтеза АН Латвийской ССР, Рига

Изучали активность аденилциклазы в мембранной фракции и в клетках асцитной карциномы Эрлиха. Образование ^{14}C -3,5-цАМФ клетками и мембранной фракцией асцитной карциномы Эрлиха увеличивается при добавлении в инкубационную среду теофиллина и NaF (10^{-3} М). Добавление адреналина (10^{-4} — 10^{-8} М) и простагландина (ПГ) E_1 (10^{-6} — 10^{-3} М) как к клеткам, так и к мембранной фракции приводит к стимуляции активности аденилциклазы. ПГЕ_2 , ПГА_2 , ПГВ_2 , $\text{ПГF}_{2\alpha}$ в концентрации 10^{-4} М не влияли на активность фермента. Опыты по блокированию эффекта адреналина пропранололом показали, что аденилциклаза клеток асцитной карциномы Эрлиха является β -адренергической системой. Дибутирил-3,5-цАМФ в концентрации 10^{-3} — 10^{-6} М вызывает значительное угнетение биосинтеза ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха. Высказано предположение об участии аденилциклазы в регуляции биосинтеза ДНК путем поддержания внутриклеточной концентрации 3,5-цАМФ.

Изучение активности аденилциклазы в злокачественных клетках позволило выявить целый ряд особенностей этого фермента. В первую очередь это касается утраты зависимости аденилциклазной реакции в злокачественных клетках от целого ряда гормонов, оказывающих выраженное влияние на активность этого фермента в нормальных клетках [1—3]. Однако, несмотря на утрату чувствительности аденилциклазы к гормонам, определенная активность этого фермента сохранялась в злокачественных клетках [4, 5]. Применение чувствительных методов определения активности аденилциклазы позволило обнаружить ее активность в высококодифференцированных клетках асцитной карциномы Эрлиха, которые, как известно, не являются клетками-мишенями для большинства гормонов [6, 7].

Функция аденилциклазы в клетках асцитной карциномы Эрлиха до конца не выяснена. Известно, что продукт аденилциклазной реакции 3,5-цАМФ является фактором, принимающим непосредственное участие в регуляции целого ряда внутриклеточных биохимических процессов [8—10]. Не исключено, что функцией аденилциклазы клеток асцитной карциномы Эрлиха является поддержание внутриклеточного уровня 3,5-цАМФ, необходимого для регуляции биохимических реакций в этих клетках.

Исходя из этого, мы поставили перед собой задачу, изучить свойства аденилциклазы и влияние 3,5-цАМФ на биосинтез макромолекул, в частности ДНК, в клетках асцитной карциномы Эрлиха.

Методика

Реактивы: теофиллин, NaF («Союзреактив»), простагландины (ПГ) — ПГЕ_1 , ПГЕ_2 , ПГА_2 , ПГВ_2 , $\text{ПГF}_{2\alpha}$ (фирма «Камбриан Кемикалз»), адреналин, пропранолол, фенитоламин (в качестве этих соединений использовали соответствующие медицинские препараты), ПЕИ.

целлюлоза (фирма «Машер и Нагель»), смола дауэкс 50 W × 8 (200—400 меш) (фирма «Сэрва»), фосфодиэстераза 3,5-цАМФ (фирма «Берингер»), дибутирил-3,5-цАМФ (СКТБ БАВ, Новосибирск). Меченые соединения: 8-¹⁴С-аденин (Всесоюзное объединение «Изотоп»), удельная радиоактивность 40 мКи/ммоль, ¹⁴С-АТФ (Чехословакия), удельная радиоактивность 390 мКи/ммоль, равномерно меченный препарат, 8-³Н-3,5-цАМФ (фирма «Амершам», Англия), удельная радиоактивность 27,5 Ки/ммоль, радионабор для определения 3,5-цАМФ (фирма «Амершам», Англия), 2-¹⁴С-тимидин (Всесоюзное объединение «Изотоп»), удельная радиоактивность 51 мКи/ммоль.

Активность аденилциклазы определяли как в intactных клетках, так и в мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Инкубация клеток. Асцитную жидкость на 9-й день после имплантации опухоли собирали в центрифужную пробирку с 5 мл кребс-рингер-бикарбонатного буфера, содержащего гепарин (50 мкг/мл). Клетки отделяли центрифугированием при 600 g в течение 15 мин. Полученный осадок вновь суспендировали в кребс-рингер-буфере и дважды центрифугировали при 600 g в течение 15 мин. При такой обработке клетки отмываются от эритроцитов. Затем осадок осторожно суспендировали в кребс-рингер-буфере и центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин. Из полученного осадка асцитных клеток готовили 20% клеточную суспензию в кребс-рингер-буфере. Выделение клеток и приготовление клеточной суспензии производили при 4°C. В каждую пробу для инкубации вносили 0,5 мл суспензии. Кроме того, пробы содержали ¹⁴С-аденин (1 мКи в пробе). Изотоп и исследуемые препараты вносили в пробы в объеме 0,1 мл. Общий объем пробы составлял 0,7 мл. Инкубацию проводили при 37°C со встряхиванием в течение различного времени. По окончании инкубации в пробы вносили 0,1 мл раствора, содержащего аденин, аденозин, АМФ, АДФ, АТФ, 3,5-цАМФ (250 мкг на 0,1 мл) и 0,2 мл холодной 50% ТХУ. Пробы центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин и тщательно собирали кислоторастворимую фракцию, в которой определяли радиоактивность ¹⁴С-3,5-цАМФ.

Инкубация мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха. Мембранную фракцию клеток асцитной карциномы Эрлиха выделяли по ранее описанной методике [9]. Выделенную фракцию суспендировали в 2×10^{-3} М глицил-глициновом буфере pH 7,9, содержащем 10^{-3} М MgSO₄ и $1,25 \times 10^{-3}$ М восстановленный глутатион. Суспензию готовили с таким расчетом, чтобы в 0,2 мл содержалось 1 мг белка. Состав инкубационной среды: 0,2 мл суспензии мембранной фракции, 0,2 мл 0,09 М трис-HCl-буфера pH 7,9, содержащего $4,5 \times 10^{-6}$ М АТФ, 10^{-2} М MgSO₄, 2,18 мг креатин-фосфата, 0,6 мг креатин-фосфокиназы и 1 мКи ¹⁴С-АТФ в объеме 0,1 мл. Теофиллин, NaF и гормоны вносились в пробы также в объеме 0,1 мл. Пробы инкубировали при 37°C со встряхиванием. По окончании инкубации пробы помещали в ледяную баню, добавляли 0,1 мл смеси нуклеотидов (по 250 мкг АТФ, АДФ, АМФ и 3,5-цАМФ), прогревали 3 мин в кипящей водяной бане, осадок отделяли центрифугированием при 2000 g в течение 15 мин и в надосадочной жидкости определяли радиоактивность 3,5-цАМФ.

Определение 3,5-цАМФ. Образовавшийся за время инкубации 3,5-цАМФ определяли методами хроматографии на бумаге, хроматографии в тонком слое ПЕИ-целлюлозы, ионообменной хроматографии на колонках со смолой дауэкс 50W × 8 (200—400 меш) и конкурентного связывания с белком.

Хроматография на бумаге. 0,04 мл надосадочного раствора, полученного после инкубации клеток или мембранной фракции, наносили на хроматографическую бумагу W 3 мм размером 24 × 36 см. В качестве свидетелей наносили 0,02 мл раствора, содержащего 100 мкг аденина, аденозина, АМФ, АДФ, АТФ и 3,5-цАМФ в 0,1 мл. Разделение производили путем восходящей хроматографии в системе изомасляная кислота — вода — аммиак (66:33:1,5) в течение 18 ч. Пятна нуклеотидов выявляли в ультрафиолете, участки, соответствующие 3,5-цАМФ, вырезали и радиоактивность определяли в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Интертехник», SL-30. В качестве радиоактивного свидетеля для проверки разделения нуклеотидов использовали 8-³Н-3,5-цАМФ.

Хроматография в тонком слое ПЕИ-целлюлозы. 0,005 мл кислоторастворимой фракции, полученной после инкубации клеток, или надосадочного раствора после инкубации мембран наносили на пластинки с ПЕИ-целлюлозой. Перед нанесением кислоторастворимой фракции ее отмывали от ТХУ, экстрагируя трижды 5 мл насыщенного водой эфира. Разделение производили в дистиллированной воде, а затем в системе 5 М ацетат аммония — этанол (5:2). В качестве свидетелей наносили 0,005 мл смеси, содержащей по 5 мкг аденина, аденозина, АМФ, АДФ, АТФ и 3,5-цАМФ. Пластинки высушивали на воздухе. Пятна проявляли в ультрафиолете. Участки, соответствующие 3,5-цАМФ, вырезали и радиоактивность определяли в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Колончатая хроматография. Нуклеотиды разделяли на колонках 0,4 × 3,3 см со смолой дауэкс 50W × 8 (200—400 меш) в H⁺-форме по методу Кришны и соавт. [11] в модификации Хаслама и соавт. [12]. Образцы наносили на колонки в объеме 0,5 мл. В качестве элюирующего буфера использовали 0,01 М калий-фосфатный буфер pH 7,3 (0,01 М KН₂PO₄ и 0,01 М КОН). В первых 2 мл элюата в основном содержится ¹⁴С-АТФ и ¹⁴С-АДФ. Последующие 5 мл элюата собирали для определения 3,5-цАМФ. Для осаждения нециклических нуклеотидов добавляли по 0,5 мл 0,25 М Ва (ОН)₂ и 0,25 М ZnSO₄ [15]. Осадки удаляли центрифугированием при 2500 g в течение 15 мин. 2 мл каждой пробы вносили в 10 мл диоксанового сцинтиллятора Брэя [13] для подсчета радиоактивности. 3,5-цАМФ идентифицировали путем рехроматографии в системах изопропанол — аммиак — вода (7:2:1) и

изопропанол — уксусная кислота — вода (6:3:1) и инкубацией с фосфодиэстеразой 3,5-цАМФ.

Метод конкурентного связывания с белком. Для определения 3,5-цАМФ использовали радиоизотоп фирмы «Амершам». В инкубационную среду вместо ^{14}C -аденина и ^{14}C -АТФ вносили немеченные вещества в концентрации: аденин 3×10^{-4} М, АТФ $4,5 \times 10^{-5}$ М. ТХУ из проб, полученных после инкубации клеток, удаляли трехкратной экстракцией эфиром. На определение образовавшегося 3,5-цАМФ из каждой пробы брали 0,05 мл. Радиоактивность определяли в сцинтилляторе Брэя.

Изучение биосинтеза ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха. Клетки получали, как описано выше. Готовили 10% суспензию клеток в среде Хенкса. Состав инкубационной среды: 1,0 мл суспензии клеток, 0,7 мл среды Хенкса, 0,1 мл ^{14}C -тимидина (0,1 мКи), 0,2 мл дибутрил-3,5-цАМФ в концентрации 10^{-4} — 10^{-5} М. Инкубацию проводили при 37°C со встряхиванием. По окончании инкубации в пробы добавляли холодную 10% ТХУ до концентрации 5%. Для определения включения ^{14}C -тимидина в кислотонерастворимую фракцию осадки наносили на мембранные фильтры «Синпор» (в) — 0,4 мкм (Хемапол). После высушивания радиоактивность определяли в жидкостном сцинтилляционном счетчике в толуоловом сцинтилляторе.

Для статистической обработки результатов использовали параметрический критерий t Стьюдента и непараметрический критерий Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты и обсуждение

Работами Викстрема и соавт. [6], Бэра и Гендерсона [7] было показано наличие активности аденилциклазы в мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха. Изучение этого фермента в интактных клетках асцитной карциномы Эрлиха не проводилось.

Таблица 1
Активность аденилциклазы (в пмоль на 100 мг клеток в 1 мин) в клетках асцитной карциномы Эрлиха

| | Метод определения 3,5-цАМФ | | |
|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | бумажная хроматография | хроматография на ПЭИ-целлюлозе | радиокомкурентное связывание |
| Контроль | 3,25±0,09 | 2,39±0,13 | 0,16±0,02 |
| Теofilлин (10 ⁻³ М) | 4,26±0,32 | 3,07±0,25 | 0,25±0,02 |
| <i>P</i> | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| Теofilлин и NaF (10 ⁻³ М) | 6,87±0,64 | 6,97±0,24 | 0,50±0,03 |
| <i>P</i> | <0,05 | <0,05 | <0,05 |

Согласно последним данным, каталитическая субъединица аденилциклазы локализована на внутренней стороне плазматической мембраны [14]. В связи с этим для создания достаточной внутриклеточной концентрации субстрата при изучении активности этого фермента в интактных клетках и тканях в качестве предшественника приходится использовать аденин или аденозин, так как АТФ, который обычно служит субстратом при изучении активности аденилциклазы, через мембрану интактных клеток

проникает в незначительном количестве [15]. В наших экспериментах был использован ^{14}C -аденин.

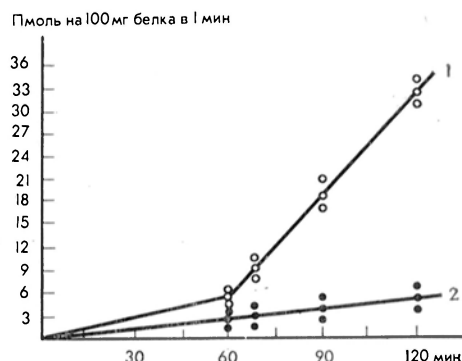
Как видно из табл. 1, добавление в инкубационную среду теofilлина в концентрации 10^{-3} М приводит к увеличению образования 3,5-цАМФ. Выраженная стимуляция аденилциклазы наблюдается при добавлении 10^{-3} М NaF.

Известно, что NaF является ингибитором многих ферментов, в частности АТФ-азы [16, 17]. Угнетение этого фермента приводит к увеличению внутриклеточной концентрации АТФ, служащего субстратом для аденилциклазной реакции. В работе Викстрема и Агрена [18] было показано, что внесение NaF в инкубационную среду, содержащую мембранную фракцию клеток асцитной карциномы Эрлиха, приводит к увеличению количества АТФ на 60%, в то время как количество образовавшегося 3,5-цАМФ увеличивается на 300%. Это свидетельствует, что, помимо увеличения концентрации АТФ, ион F^- , по-видимому, обладает и прямым действием на активность аденилциклазы. Для проверки этого предположения на интактных

клетках был поставлен следующий опыт. В первой группе проб NaF вносили в инкубационную среду одновременно с ^{14}C -аденином, во второй клетки инкубировали с ^{14}C -аденином в течение 1 ч, затем вносили NaF и продолжали инкубацию. Таким образом, во второй группе проб к моменту внесения NaF в клетках уже создается определенная концентрация ^{14}C -АТФ. Наблюдаемую выраженную стимуляцию аденилциклазы под влиянием NaF во второй группе проб нельзя объяснить только действием иона F' на активность АТФ-азы, поскольку

Рис. 1. Влияние NaF на активность аденилциклазы в клетках асцитной карциномы Эрлиха.

Клетки инкубировали в кребс-рингер-буфере с 1 мкКи ^{14}C -аденина. Радиоактивность 3,5-цАМФ определяли методом бумажной хроматографии. 1 — инкубация в течение 60 мин с теофиллином (10^{-3} М), затем вносили NaF (10^{-3} М); 2 — инкубация в течение всего времени с теофиллином и NaF (10^{-3} М).



стимулирующее действие проявляется в очень короткий срок (рис. 1). Возможным объяснением может служить наличие у иона F' прямого действия на каталитическую активность аденилциклазы. Прямое действие иона F' на каталитическую активность аденилциклазы подтверждается данными о том, что значение K_m для АТФ не меняется в присутствии NaF [7].

В работе Бэра и Гендерсона [7] было показано, что добавление адреналина и ПГЕ₁ к мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха приводит к повышению активности аденилциклазы [7]. На интактных клетках действие этих гормонов не проверялось. В наших экспериментах внесение адреналина (10^{-5} М) и ПГЕ₁ (5×10^{-5} М) в суспензию клеток асцитной карциномы Эрлиха также приводило к повышению активности аденилциклазы (табл. 2). Чувствительность аденилциклазы клеток асцитной карциномы Эрлиха к адреналину и ПГЕ₁ сходна с таковой лейкоцитов человека и клеток миокарда морских свинок, которые также проявляют чувствительность к этим гормонам [19, 20].

Как видно из табл. 3, значительная активность аденилциклазы определяется также и в мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха. Внесение в инкубационную среду теофиллина и NaF (10^{-2} М) приводит к увеличению количества вновь образующегося ^{14}C -3,5-цАМФ.

Значительная стимуляция аденилциклазы в мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха происходит при внесении в инкубационную среду адреналина (10^{-8} — 10^{-4} М) и ПГЕ₂ (10^{-5} — 10^{-3} М). При этом наблюдается четкая зависимость эффекта от дозы гормона (рис. 2). По дан-

Таблица 2

Влияние NaF, адреналина и ПГЕ₁ на активность аденилциклазы (в пмоль на 100 мг клеток в 1 мин) в клетках асцитной карциномы Эрлиха

| | Метод определения 3-5-цАМФ | |
|--|----------------------------|--------------------------------|
| | бумажная хроматография | хроматография на ПЕИ-целлюлозе |
| Контроль | 0,91±0,04 | 2,97±0,39 |
| NaF (10^{-3} М) | 5,87±0,58 | 6,93±0,28 |
| <i>P</i> | <0,05 | <0,05 |
| Адреналин (10^{-5} М) | 1,43±0,12 | 4,17±0,55 |
| <i>P</i> | <0,05 | <0,05 |
| ПГЕ ₁ (5×10^{-4} М) | 2,75±0,47 | 5,06±0,33 |
| <i>P</i> | <0,05 | <0,05 |

Примечание. Клетки инкубировали в кребс-рингер-бикарбонатном буфере с 1 мкКи ^{14}C -аденина в течение 90 мин. Все пробы содержали 10^{-3} М теофиллин.

ным Бэра и Гендерсона [7], действие адреналина и ПГЕ₁ в максимально эффективных концентрациях не является аддитивным, что свидетельствует о связи рецепторных участков этих гормонов с одной каталитической субъединицей.

Т а б л и ц а 3

Влияние теофиллина и NaF на активность аденилциклазы (в пмоль на 1 мг белка в 1 мин) в мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха

| | Метод определения 3,5-цАМФ | |
|--------------------------------|--|--------------------------------|
| | хроматография на колонках (0,4 × 3,3 см) со смолой дауэкс 50 W × 8 | хроматография на ПЕИ-целлюлозе |
| Контроль | 0,38 ± 0,02 | 0,27 ± 0,04 |
| NaF (10 ⁻² М) | 1,32 ± 0,01 | 1,47 ± 0,04 |
| <i>P</i> | < 0,05 | < 0,05 |
| NaF (10 ⁻³ М) | 0,67 ± 0,04 | 0,45 ± 0,05 |
| <i>P</i> | < 0,05 | 0,05 |
| NaF (10 ⁻⁴ М) | 0,27 ± 0,01 | 0,27 ± 0,07 |
| <i>P</i> | — | — |
| Теофиллин (10 ⁻² М) | 0,48 ± 0,02 | 0,35 ± 0,02 |
| <i>P</i> | < 0,05 | < 0,05 |
| Теофиллин (10 ⁻³ М) | 0,41 ± 0,01 | 0,25 ± 0,05 |
| <i>P</i> | < 0,05 | — |
| Теофиллин (10 ⁻⁴ М) | 0,38 ± 0,03 | 0,23 ± 0,02 |
| <i>P</i> | — | — |

Примечание. Каждая проба содержала 1 мг белка мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха. Инкубацию проводили в течение 20 мин с 1 мкКи ¹⁴С-АТФ.

аденилциклаза к клеткам асцитной карциномы Эрлиха относится к β-адренергическим системам. Относительно функции аденилциклазы в клетках асцитной карциномы Эрлиха до настоящего времени нет еди-

Пмоль на 1 мг белка в 1 мин

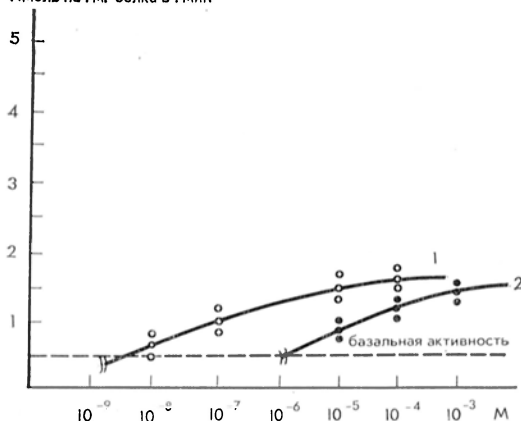


Рис. 2. Влияние адреналина и ПГЕ₁ на активность аденилциклазы в мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Активность аденилциклазы определяли методом ионообменной хроматографии на смоле дауэкс 50W × 8 (200—400 меш). 1 — адреналин; 2 — ПГЕ₁.

ного мнения. Учитывая тот факт, что плазматические мембраны этих клеток обладают способностью синтезировать АТФ экстрацеллюлярно, было высказано предположение, что аденилциклаза может играть существенную роль в освобождении ионов Са⁺⁺ из связанного с АТФ состояния, переводя ассоциированный комплекс Са⁺⁺ — АТФ в диссоциированный, при этом образуется 3,5-цАМФ, не являющийся хелатором ионов Са⁺⁺ [6, 21, 22].

Однако у этого фермента возможно наличие и другой функции — участие в регуляции биосинтеза макромолекул. В ряде работ было показано, что увеличение внутриклеточной концентрации 3,5-цАМФ в злокачественных клетках приводит к угнетению биосинтеза ДНК [23, 24]. Физиологические концентрации 3,5-цАМФ обладают стимулирующим действием на культуры нормальных клеток, в то же время повышение концентрации 3,5-цАМФ приводит к угнетению биосинтеза ДНК, стимулированного фитогемагглютинином [25]. Было также отмечено, что внутриклеточное содержание 3,5-цАМФ в медленно растущих культурах выше, чем в быстрорастущих [26, 27]. Таким образом, интенсивный синтез ДНК характерен для клеток с низким содержанием 3,5-цАМФ, повышение же внутриклеточной концентрации этого нуклеотида приводит к угнетению биосинтеза ДНК.

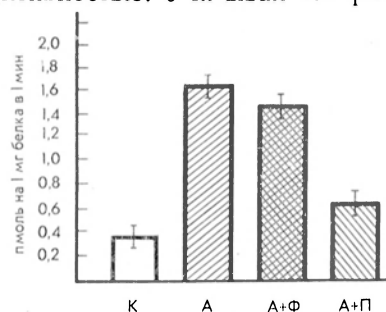
В наших экспериментах биосинтез ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха был угнетен под влиянием дибутирил-3,5-цАМФ (10^{-3} — 10^{-4} М) при 30- и 60-минутной инкубации, причем увеличение времени инкубации приводило к более выраженному угнетению включения ^{14}C -тимидина в кислотонерастворимую фракцию клеток (табл. 4). В этих экспериментах был использован дибутирил-3,5-цАМФ, так как известно, что это соединение обладает значительно большей способностью проникать через плазматическую мембрану по сравнению с 3,5-цАМФ.

Добавление в инкубационную среду бутирата натрия не вызывало изменений в биосинтезе ДНК.

Результаты работы свидетельствуют о том, что клетки асцитной карциномы Эрлиха обладают аденилциклазной активностью. Учитывая тот факт,

Рис. 3. Влияние фентоламина и пропранолола на стимулируемую адреналином активность аденилциклазы в мембранной фракции клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Активность аденилциклазы определяли методом ионообменной хроматографии на колонках ($3,3 \times 0,4$ см) со смолой дауэкс 50W \times 8 (200—400 меш). К — контроль; А — адреналин (10^{-4} М); А + Ф — адреналин + фентоламин (10^{-4} М); А + П — адреналин + пропранолол (10^{-4} М).



Т а б л и ц а 4

Влияние дибутирил-3,5-цАМФ и бутирата натрия на биосинтез ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха

| Продолжительность инкубации | Препарат | Включение ^{14}C -тимидина | | Р |
|--|--|-------------------------------------|---------------|-------|
| | | имп/мин на 100 мг клеток | % от контроля | |
| 30 мин | — | 11 280±820 | — | — |
| | Дибутирил-3,5-цАМФ (10^{-4} М) | 6 600±320 | 58,5 | 0,05 |
| | Дибутирил-3,5-цАМФ (10^{-5} М) | 10 550±430 | 93,5 | — |
| | Бутират натрия (2×10^{-4} М) | 9 800±700 | 86,9 | — |
| 30 мин преинкубации без метки, 60 мин инкубации с ^{14}C -тимидином | — | 13 120±1300 | — | — |
| | Дибутирил-3,5-цАМФ (10^{-3} М) | 4 400±200 | 33,5 | <0,05 |
| | Дибутирил-3,5-цАМФ (10^{-4} М) | 6 530±310 | 49,7 | <0,05 |
| | Дибутирил-3,5-цАМФ (10^{-5} М) | 9 117±400 | 69,4 | <0,05 |
| | Бутират натрия (2×10^{-3} М) | 17 360±2600 | 132,3 | — |
| | Бутират натрия (2×10^{-4} М) | 9 800±700 | 86,9 | — |

что дибутирил-3,5-цАМФ (аналог 3,5-цАМФ) обладает влиянием на биосинтез ДНК, можно предположить участие аденилциклазы клеток асцитной карциномы Эрлиха в регуляции биохимических реакций в этих клетках путем поддержания внутриклеточной концентрации 3,5-цАМФ на необходимом для этих процессов уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allen D., Munshower J., Morris H. P. et al. — Cancer Res., 1971, v. 31, p. 557. — 2. Butcher F. R., Scott D. F., Potter V. R. et al. — Ibid., 1972, v. 32, p. 2135. — 3. Rosen O. M., Hirsch A., Goren E. — Arch. Biochim., 1971, v. 146, p. 660. — 4. Ney R. L., Hochella N., Dexter R. N. et al. — J. clin. Invest., 1969, v. 48, p. 1733. — 5. Macchia V., Meldolesi M. F., Chiariello M. — Endocrinology, 1972, v. 90, p. 1483. — 6. Wikström B., Ronquist G. et al. — Acta chem. Scand., 1971, v. 25, p. 3785. — 7. Bar H.-P., Henderson J. F. — Canad. J. Biochem., 1972, v. 50, p. 1003. — 8. De Nayer P. — Biochimie, 1973, v. 55, p. 1506. — 9. Jost J. P., Hsie A., Hughes S. D. et al. — J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 351. — 10. Chang-Cheng Ch., Oliver J. T. — Biochemistry (Wash.), 1971, v. 10, p. 2990. — 11. Krishna G., Weiss B., Brodie B. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1968, v. 163, p. 379. — 12. Haslam R. J., Lynham J. A. — Life Sci., 1972, v. 23, p. 1143. — 13. Bray G. A. — Analyt. Biochem., 1960, v. 1, p. 279. — 14. Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. — In: Fundamental Concepts in Drug-Receptor Interactions. New York, 1970, p. 59. — 15. Daly J. W. — In: Methods in Cyclic Nucleotide Research. Ed. M. Chasin. New York, 1972, p. 255. — 16. Melson G. L., Chase L. R., Aurbach G. D. — Endocrinology, 1970, v. 86, p. 511. — 17. Stansfield D. A., Franks D. J. — Biochim. biophys. Acta, 1971, v. 242, p. 606. — 18. Wikström B. E., Agren G. — Cancer Res., 1973, v. 33, p. 2714. — 19. Buorne H. K., Lehrer R. J., Cline M. J. et al. — J. clin. Invest., 1971, v. 50, p. 920. — 20. Sobel B. E., Robinson A. G. — Circulation, 1969, v. 40, Suppl. 3, p. 189. — 21. Agren G., Ronquist G. — Acta physiol. scand., 1969, v. 75, p. 124. — 22. Rasmussen H., Tenenhouse A. — Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A., 1968, v. 163, p. 379. — 23. Abel C. W., Kamp C. W., Johnson L. D. — Cancer Res., 1970, v. 30, p. 717. — 24. Johnson L. D., Abel C. W. — Ibid., 1970, v. 30, p. 2718. — 25. Seifert N., Paul D. — Nature. New Biol., 1972, v. 240, p. 281. — 26. Heidrick M. L., Ryan W. L. — Cancer Res., 1971, v. 31, p. 1313.

УДК 616.45-001.1/.3-092.9-06:616.36-008.9:9:612.013.7

Ф. З. Меерсон, В. И. Павлова, Ф. Х. Камилов, В. С. Якушев

НАРУШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ПЕЧЕНИ ПРИ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОМ СТРЕССЕ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ЭТИХ НАРУШЕНИЙ ГАММАОКСИБУТИРАТОМ НАТРИЯ

Лаборатория патофизиологии сердца Института общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва, кафедра физиологии и анатомии Челябинского педагогического института, кафедра биохимии Челябинского медицинского института

Изучалось влияние эмоционально-болевого стресса на содержание и биосинтез гликогена в печени крыс, а также на переход ^{14}C из основных субстратов цикла трикарбонных кислот (ЦТК) в CO_2 , выделяемый срезами печени. Выяснилось, что под влиянием эмоционально-болевого стресса происходят мобилизация гликогенных депо и угнетение синтеза гликогена в печени, а также торможение окисления в ЦТК пирувата, аспартата, сукцината и α -кетоглутарата. Одновременно под влиянием стресса развиваются язвенные поражения слизистой оболочки желудка. Наблюдаемые изменения с большей долей вероятности объясняются избыточным влиянием адренергической и симпато-адреналовой систем и в значительной мере предотвращаются посредством введения перед эмоционально-болевым стрессом гаммаоксibuтирата натрия, который активизирует тормозную ГАМК-эргическую систему головного мозга.

Возбуждение адренергической и симпато-адреналовой систем является важным компонентом адаптационной реакции организма на чрезвычайные раздражители и опасные ситуации окружающей действительности. Через эти компоненты реакции мобилизуются гликогенные депо, активируются процессы глюконеогенеза и трансаминирования [1—3] и тем самым проис-

ходит энергетическое обеспечение срочного приспособления организма к изменениям среды. Однако избыточный эффект катехоламинов и глюкокортикоидов при чрезмерных и длительных напряженных ситуациях может привести к развитию стрессорных повреждений внутренних органов, наиболее частыми из которых являются язвенные поражения желудка [4].

В последнее время установлено, что язвенные поражения желудка и нарушения функции сердца, возникающие у животных под влиянием эмоционально-болевого стресса, могут быть эффективно предупреждены введением ГОМК — гаммаоксипропаноата натрия. ГОМК действует на уровне тормозной стрионигральной системы нейронов головного мозга, вызывая там накопление тормозного медиатора — гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) — и тем самым ограничивая возбуждение при эмоционально-болевым стрессе. Для понимания механизма профилактического эффекта ГОМК при этом виде стресса представляется необходимым выяснить, как действует этот фактор на изменения энергетического метаболизма, обычно возникающие под влиянием стресса; при этом следует иметь в виду, что одной из главных мишеней эффекта глюкокортикоидов и катехоламинов в организме является печень.

В данной работе изучалось влияние самого эмоционально-болевого стресса и стресса на фоне предварительного введения ГОМК на некоторые стороны энергетического метаболизма печени. Цель исследования состояла в том, чтобы выявить изменения, возникающие под влиянием стрессовых ситуаций в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) и гликолизе, а затем оценить возможность предупреждения этих изменений с помощью предварительного введения ГОМК.

Методика

Опыты были проведены на 197 крысах-самках линии Вистар массой 180—200 г. Животные были разделены на 3 серии: I серия — контрольные крысы ($n=69$), II серия — крысы, подвергшиеся действию эмоционально-болевого стресса ($n=71$) по методу [5], использованному нами ранее, III серия — крысы, подвергшиеся ЭБС на фоне введения ГОМК ($n=67$). ГОМК животным этой серии вводили перед стрессом и через 3 ч после начала его в дозе 75 мг/кг. Все животные были декапитированы через 2 ч после завершения эмоционально-болевого стресса. Повреждающий эффект его оценивали по количеству и суммарной длине язвенных поражений желудка у каждого животного.

Для оценки интенсивности окисления основных субстратов ЦТК срезы печени инкубировали с этими субстратами, меченными по ^{14}C , и измеряли включение метки в CO_2 . При этом были использованы следующие вещества: 4- ^{14}C -аспартат, 5- ^{14}C -глутамат, 1- ^{14}C -глюкоза, 1,2- ^{14}C -лактат, 1- ^{14}C -стеарат и 1,2- ^{14}C - α -кетоглутарат. Тканевые срезы инкубировали в физиологическом растворе в аппарате Варбурга в атмосфере воздуха при 37°C в течение 40 мин. Фиксацию $^{14}\text{CO}_2$ проводили по методу М. И. Прохоровой и З. Н. Тушиковой [6]. Все изотопы стандартизировали по величине счета и в каждую пробу вводили по 75 000—80 000 имп/мин. Для работы были использованы изотопы со следующей удельной радиоактивностью: аспартат — 28 мКи/ммоль; глутамат — 6,3 мКи/ммоль; глюкоза — 53 мКи/ммоль; лактат — 2,9 мКи/ммоль; стеарат — 20 мКи/ммоль и α -кетоглутарат — 1,2 мКи/ммоль. Радиометрию проводили на установке ДП-100 с торцовым счетчиком БФЛТ-25. Результаты выражали в имп/мин на 1 мг CO_2 с учетом поправок на фон и самопоглощение.

Содержание гликогена в печени исследовали по методу [7]. Животных целиком погружали в жидкий азот. Навеску ткани подвергали десмолизу 30% раствором КОН. Из щелочной смеси осаждали гликоген добавлением 96% охлажденного спирта. После трехкратного переосаждения часть гликогена подвергали гидролизу в 2 н. серной кислоте с последующим определением количества образовавшейся глюкозы [8]. Для изучения биосинтеза гликогена внутрибрюшинно вводили равномерно меченную ^{14}C -глюкозу в дозе 100 мКи на 100 г, а также 2- ^{14}C -глицин в дозе 20 мКи на 100 г веса сразу после 5-часового стресса. Время инкубации метки — 2 ч. После выделения гликогена из печени его растворяли в горячей дистиллированной воде и наносили на мишени. Последние подвергали радиометрическому контролю. Удельную радиоактивность выражали в импульсах в минуту на 10 мг гликогена после усреднения величин радиоактивности от двух проб и учета количества гликогена в пробах. Одновременно с этим рассчитывали общую активность в импульсах в минуту на количество гликогена в 1 г ткани [9].

Результаты и обсуждения

При вскрытии выяснилось, что, как и в ранее опубликованных исследованиях, эмоционально-болевой стресс вызвал у всех крыс развитие яз-

Т а б л и ц а 1

Влияние эмоционально-болевого стресса и предварительного введения ГОМК на окисление основных интермедиатов ЦТК срезами печени (по включению из интермедиатов ЦТК В $^{14}\text{C}\text{O}_2$ в имп/мин на 1 мг)

| Серии опытов | 1-3- ^{14}C -лактат (n = 6) | 1- ^{14}C -стеарат (n = 8) | ^{14}C -аспартат (n = 6) | 1, 2- ^{14}C - α -кетоглутарат (n = 7) | 1, 4- ^{14}C -сукцинат (n = 6) | 5- ^{14}C -глутамат (n = 7) | 1- ^{14}C -глюкоза (n = 9) |
|--------------|---|--|--------------------------------------|---|--|---|--|
| I | 5400 \pm 509 | 1550 \pm 210 | 31 166 \pm 1 720 | 18 400 \pm 2 249 | 39 000 \pm 4 000 | 12 800 \pm 1 275 | 1 020 \pm 165 |
| II | 1225 \pm 193 | 6625 \pm 986 | 1 205 \pm 133 | 5 240 \pm 370 | 15 800 \pm 1 933 | 7 500 \pm 935 | 4 200 \pm 460 |
| P I-II | <0,001 | <0,05 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,05 | <0,05 |
| III | 3450 \pm 270 | 1540 \pm 259 | 15 000 \pm 1 820 | 14 166 \pm 400 | 16 500 \pm 612 | 10 800 \pm 1 200 | 1 400 \pm 87 |
| P I-III | >0,05 | >0,05 | <0,001 | <0,05 | <0,01 | <0,05 | >0,5 |

венных поражений слизистой оболочки желудка. Среднее количество язв на одну крысу составляло 7—8, а их суммарная длина — 22,2 мм. На фоне введения ГОМК у половины животных язвы вообще не возникали, а у остальных количество язв было уменьшено в 3,2 раза, а их суммарная длина — в 2,4 раза.

Данные, характеризующие скорость перехода меченого углерода различных субстратов, используемых срезами печени, в CO_2 , представлены в табл. 1. Из материала табл. 1 следует, что у животных, перенесших эмоционально-болевой стресс, существенно заторможено окисление лактата, α -кетоглутара, сукцината, а также аспартата и глутамата. Окисление глюкозы, меченой по первому углеродному атому, и стеариновой кислоты, напротив, ускорено. Предварительное введение ГОМК полностью устранило или ослабило все эти изменения, за исключением торможения использования сукцината.

Оценивая возможный механизм этих явлений, следует иметь в виду, что печень — одна из главных мишеней глюкокортикоидов, концентрация которых в крови во время стресса может возрасть в 4—10 раз [4]. Известно, что глюкокортикоиды вызывают в печеночных клетках активацию биосинтеза ферментов глюконеогенеза, трансаминирования и пентозофосфатного шунта [2]. Активация глюконеогенеза приводит к использованию больших количеств главного интермедиата и регулятора ЦТК — щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) для образования фосфоэнолпирувата. Значительный отток ЩУК и уменьшение ее доступности в ЦТК должны привести к снижению интенсивности цитратсинтетазной реакции и тем самым к снижению скорости вовлечения ацетил-КоА в ЦТК. Это становится причиной уменьшения использования и окисления пирувата и, как следствие, лактата печеночной тканью. Окислению аспартата предшествует превращение его в ЩУК; повышенное удаление образовавшейся таким образом ЩУК из ЦТК приводит к тому, что окисление углеродного скелета аспартата в ЦТК замедляется соответственно замедлению перехода ^{14}C -углерода из аспартата в CO_2 .

Аналогичным образом недостаток ЩУК обуславливает замедление перехода ^{14}C -углерода из сукцината в CO_2 , так как декарбоксилирование углеродного скелета сукцината совершается в ЦТК после преобразования его через ряд стадий в изолимонную кислоту, преобразование это нарушено недостатком ЩУК. В полном соответствии с этими рассуждениями включение ^{14}C -углерода в CO_2 , выделяемый срезами печени, оказалось уменьшенным при эмоционально-болевым стрессе для лактата в 4 раза,

для сукцината — более чем в 2 раза и для аспартата — в 2,5 раза. Нарушение окисления α -кетоглутарата, наблюдаемое при эмоционально-болевым стрессе, по-видимому, не зависит от недостатка ЩУК, так как уменьшение образования α -кетоглутарата из изолимонной кислоты само по себе должно было бы привести к уменьшению разведения добавленной к срезам метки и ускоренному включению ее в CO_2 . Наблюдавшийся в этих экспериментах обратный результат с наибольшей долей вероятности может быть обусловлен снижением активности НАД-зависимой α -кетоглутарат-дегидрогеназы, которая реализует декарбоксилирование и дегидрирование α -кетоглутарата.

Прямые данные об активности этой мультэнзимной системы при эмоционально-болевым стрессе в настоящее время отсутствуют. Однако показано, что активность другой НАД-зависимой системы, а именно малатдегидрогеназы, при этом состоянии снижена.

Т а б л и ц а 2

Влияние эмоционально-болевого стресса и ГОМК на содержание и биосинтез гликогена в печени крыс

| Серия опытов | Содержание, мг % | Удельная радиоактивность, имп/мин на 10 мг гликогена | | Общая радиоактивность, имп/мин на количество гликогена в 1 г ткани | |
|--------------------|------------------|--|-------------------------|--|-------------------------|
| | | ^{14}C -глюкоза | ^{14}C -глицин | ^{14}C -глюкоза | ^{14}C -глицин |
| I $n=22$ | 2400 ± 185 | 3033 ± 181 | 683 ± 65 | 7272 ± 615 | 1623 ± 136 |
| II ($n=24$) | 1355 ± 101 | 2250 ± 227 | 766 ± 61 | 2825 ± 196 | 1000 ± 101 |
| $P_{\text{I-II}}$ | $<0,05$ | $\geq 0,05$ | $>0,05$ | $<0,05$ | $>0,05$ |
| III ($n=20$) | 2837 ± 273 | 1416 ± 160 | 1500 ± 77 | 4126 ± 305 | 4200 ± 318 |
| $P_{\text{I-III}}$ | $>0,05$ | $<0,05$ | $<0,05$ | $<0,05$ | $<0,05$ |

Существенно, что торможение декарбоксилирования α -кетоглутарата независимо от возникающей причины увеличивает возможность переамилирования его в глутамат, который при активации трансаминирования под влиянием глюкокортикоидов закономерно накапливается в печени.

Это должно было приводить к разведению метки экзогенного ^{14}C -глутамата и вполне объясняет наблюдавшееся в наших опытах торможение перехода меченого углерода глутамата в CO_2 . В условиях организма такое накопление глутамата, по-видимому, может иметь иные, значительно более важные последствия. В частности, глутамат из печени может усиленно поступать в кровь, далее в различные органы и, в частности, в мозг и сердце. В мозге и сердце, как показано нами ранее, расход глутамата при эмоционально-болевым стрессе резко увеличен для синтеза тормозного медиатора — ГАМК.

Наконец, развивающаяся под влиянием глюкокортикоидов активация пентозофосфатного шунта и апотомического окисления глюкозы является наиболее вероятной причиной отмеченного нами четырехкратного увеличения поступления ^{14}C -углерода глюкозы, меченой по первому углеродному атому, в CO_2 .

Наиболее существенный результат описанных опытов состоит в том, что этот характерный для глюкокортикоидного эффекта комплекс метаболических сдвигов, вызванных эмоционально-болевым стрессом, в значительной мере снимается предварительным введением ГОМК.

Результаты следующего эксперимента, в котором изучалось влияние эмоционально-болевого стресса и ГОМК на содержание и синтез гликогена, представлены в табл. 2. Из материала табл. 2 следует, что стресс приводит к падению концентрации гликогена в 2 раза при одновременном торможении ресинтеза гликогена по включению равномерно меченой ^{14}C -глюкозы и глицина. Мобилизация гликогенного резерва печени под влиянием стресса достаточно хорошо известна и является результатом действия катехол-

аминов, которые через фосфорилазную систему активируют гликогенолиз и вызывают выход глюкозы в кровь.

Тот факт, что мобилизация гликогенного резерва сочетается при эмоционально-болевым стрессе с торможением ресинтеза гликогена, по-видимому, обусловлен тем, что глюкозо-6-фосфат, образующийся в результате активации первых стадий гликолиза и поступления глюкозы из крови, не используется как обычно для ресинтеза гликогена, а за счет дефосфорилирования превращается в глюкозу и выделяется в кровь. Глюкоза-6-фосфат может подвергаться также апотомическому окислению, которое, как показано выше, резко активировано при эмоционально-болевым стрессе. В итоге включение меченой глюкозы в гликоген оказывается уменьшенным в 2,5 раза. Значительное уменьшение включения меченого углерода глицина в гликоген реализуется при стрессе, несмотря на активацию реакции глюконеогенеза, обеспечивающего превращение глицина в пируват. Вероятно, это происходит потому, что использование глюкозо-6-фосфата, образованного из пирувата, ограничено рассмотренными только что факторами.

Таким образом, изменение гликогенолиза при эмоционально-болевым стрессе, выражающееся в мобилизации гликогенного резерва и торможении ресинтеза гликогена, с большой долей вероятности может быть объяснено сочетанием действий глюкокортикоидов и катехоламинов. Наиболее существенно, что предварительное введение ГОМК полностью снимает все изменения содержания и ресинтеза гликогена, вызванные стрессом (см. табл. 2).

Оценивая полученные результаты, следует подчеркнуть, что рассмотренные выше изменения метаболизма, возникшие в печени под влиянием эмоционально-болевого стресса, регуляторно обусловлены и играют существенную роль в обеспечении адекватной реакции организма на чрезвычайные раздражители среды. Роль эта определяется тем, что в результате мобилизации гликогенного резерва, активации глюконеогенеза и трансаминирования из печени в кровь поступают глюкоза, глутамат и, возможно, другие вещества, используемые в мозге, сердце, скелетных мышцах, т. е. в системах, которые играют самую непосредственную роль в адапционных реакциях организма.

Существенно в этом плане, что доказанное ранее и косвенно проявившееся в наших экспериментах увеличение образования глутамата в печени и выделение его в кровь при действии больших доз глюкокортикоидов сочетаются в условиях стресса с увеличенным использованием глутамата и снижением его содержания в мозге и сердце, где эта аминокислота интенсивно используется для образования тормозного медиатора — ГАМК [10]. Оценивая активацию образования тормозного медиатора в мозге как защитную реакцию организма, ограничивающую чрезмерное возбуждение, можно думать, что увеличение трансаминирования и образования глутамата в печени является существенной предпосылкой реализации этого охранительного механизма.

Предварительное введение ГОМК в наших экспериментах в значительной степени предупреждает как развитие язвенных поражений желудка, так и характерное для стресса изменение метаболизма печени. Для понимания механизма этого профилактического эффекта следует иметь в виду, что, действуя на уровне головного мозга, ГОМК, во-первых, угнетает распад тормозного медиатора [11] и, во-вторых, увеличивает степень активации биосинтеза ГАМК из глюкозы при эмоционально-болевым стрессе. В совокупности это должно приводить к увеличению содержания ГАМК и активации стрионигральной системы тормозных, ГАМК-эргических нейронов. В результате избыточное возбуждение центров, контролирующих деятельность адренергической и симпато-адреналовой систем при стрессе, не реализуется, и вследствие этого не развиваются стрессорные изменения метаболизма печени и язвенные поражения желудка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Селъе Г. (Selye H.) Очерки об адаптационном синдроме. М., 1960. —
2. Feigelson P., Feigelson M. — In: Litwack G. (Ed.) Actions of Hormones on Molecular Processes. London, 1964, p. 218—233. — 3. Горизонтов П. Д. и др. Патологическая физиология экстремальных состояний. М., 1973. — 4. Кем К. Л., Сигг Е. В. — «Pharmacol. Biochem. Behav.», 1976, v. 4, p. 289—297. —
5. Desiderato O., MacKinnon I. R., Hissom H. J. — «J. Comp. Physiol. Psychol.», 1974, v. 87, p. 208. — 6. Прохорова М. И., Тупикова З. Н. Методы исследования радиоактивного углерода. Л., 1959. — 7. Год С. А., Крамер Н., Сомогуй М. — «J. biol. Chem.», 1933, v. 100, p. 485. — 8. Nelson N. — «J. biol. Chem.», 1944, v. 153, p. 375. — 9. Прохорова М. И. — В кн.: Нервная система. Вып. 7. Л., 1966, с. 5. — 10. Есаян Н. А. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Вып. 7. Ереван, 1972, с. 181—201. —
11. Островская Р. У., Зубовская А. М., Бойко С. С. — «Бюлл. экпер. биол.», 1975, № 5, с. 68.

Поступила 30/X 1977 г.

IMPAIRMENT OF ENERGY METABOLISM IN LIVER TISSUE UNDER CONDITIONS OF STRESS CAUSED BY PAIN AND EMOTION AND PREVENTION OF THE IMPAIRMENTS BY TREATMENT WITH SODIUM γ -HYDROXYBUTYRATE

F. Z. Meerson, V. I. Pavlova, F. Kh. Kamilov, V. S. Yakushev

Laboratory of Heart Pathophysiology, Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Academy of Medical Sciences of the USSR,
Chair of Physiology and Anatomy, Pedagogical Institute, Chair of Biochemistry, Medical
School, Chelyabinsk

Content and biosynthesis of glycogen in rat liver tissue as well as transition of ^{14}C from main substrates of tricarboxylic acid cycle to CO_2 , examined in liver slices, were studied under conditions of stress caused by pain and emotion. The stress was accompanied by mobilization of the glycogen deposits; glycogen synthesis in liver tissue and oxidation of pyruvate, aspartate, succinate or α -ketoglutarate in tricarboxylic acid cycle were inhibited. At the same time, the stress was accompanied by ulcerous impairments of gastric mucosa. The phenomena observed appear to be due to increased activity of adrenergic and sympathoadrenal systems. Prior to the stress administration of sodium γ -hydroxybutyrate, which activates the inhibitory GHB-ergic system of brain, prevented distinctly the impairments found.

УДК 616.5-003.214-056.43-07:[616.153:577.175.85]-074

Г. Т. Бляян, А. С. Погосян, М. А. Степанян, Э. Н. Осипова

РОЛЬ КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО СИНДРОМА ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ВАСКУЛИТЕ

Армянский институт гематологии и переливания крови им. Р. О. Еоляна Министерства
здравоохранения Армянской ССР, Ереван

Суммарная эстеразная активность плазмы крови здоровых лиц равна $27,4 \pm 4,96$ мкмоль/мл/ч, активность калликреина — $74,4 \pm 8,65$ мкмоль гидролизованного субстрата в 1 ч на 1 мл плазмы, ингибиторная емкость плазмы крови по отношению к калликреину — $0,9 \pm 0,1$ усл. ед. Суммарная эстеразная активность плазмы крови, отражающая активность протеиназ трипсинозного типа, в том числе калликреина, у больных геморрагическим васкулитом достоверно повышена по сравнению с контрольной группой, а количество прекалликреина и ингибиторная емкость плазмы крови по отношению к калликреину снижены. У тяжелобольных геморрагическим васкулитом наблюдается еще большая активация кининовой системы крови за счет снижения калликреина и ингибиторной емкости плазмы крови по отношению к калликреину.

В последние годы внимание исследователей привлекли вещества полипептидной природы, называемые кининогормонами, или плазмокининами, обладающими выраженной биологической активностью [1—3].

Появились работы, указывающие на возможность участия кининов в патогенезе заболеваний кожи и кожных формах геморрагического васку-

лита [4—6]. Несмотря на это, патогенез геморрагических проявлений у больных геморрагическим васкулитом все еще остается неясным, а патогенетическая терапия разработана недостаточно.

Методика

Компоненты кининовой системы крови изучали в период разгара болезни почти при всех формах заболевания у 25 больных геморрагическим васкулитом в возрасте от 16 до 70 лет (12 женщин и 13 мужчин).

Таблица 1

Компоненты кининовой системы крови у здоровых и больных геморрагическим васкулитом

| Показатель | Здоровые | Больные геморрагическим васкулитом | P |
|--|-------------------|------------------------------------|-------|
| Суммарная эстеразная активность, мкмоль/мл/ч | 27,4±4,96 (18) | 57±6,86 (25) | <0,01 |
| Прекалликреин, мкмоль гидролизованного субстрата в 1 ч на 1 мл плазмы | 74,4±8,65 (18) | 47±6,3 (23) | <0,05 |
| Ингибиторная емкость плазмы крови, усл. ед. (по отношению к калликреину) | 0,9±0,1 (18) | 0,4±0,1 (24) | <0,01 |

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

Таблица 2

Показатели кининовой системы у больных геморрагическим васкулитом с различной тяжестью клинического течения (средние данные)

| Показатель | Легкое течение | Тяжелое течение |
|--|----------------|-----------------|
| Суммарная эстеразная активность, мкмоль/мл/ч | 55 (7) | 47,4 (9) |
| Прекалликреин, мкмоль гидролизованного субстрата в 1 ч на 1 мл плазмы | 71,8 (7) | 34,7 (9) |
| Ингибиторная емкость плазмы крови, усл. ед. (по отношению к калликреину) | 0,65 (7) | 0,4 (9) |

($P<0,05$), ингибиторная емкость плазмы крови по отношению к калликреину — $0,4\pm0,1$ усл. ед. ($P<0,01$), суммарная эстеразная активность — $57\pm6,86$ мкмоль/мл/ч ($P<0,01$). Как видно из наших данных, уровень суммарной эстеразной активности у больных геморрагическим васкулитом достоверно повышен, а количество прекалликреина и ингибиторная емкость плазмы крови по отношению к калликреину достоверно уменьшены. Эти данные говорят об активации кининовой

Кожный синдром наблюдался у 9 больных, кожно-суставной — у 7, кожно-абдоминальный — у 2, кожно-суставно-абдоминальный — у 5, кожно-суставно-абдоминально-почечный — у 2. У 4 из 25 больных течение заболевания было хроническим, у остальных заболевание протекало остро.

Независимо от формы заболевания тяжелое течение с абдоминально-почечным и легким синдромом, обильным геморрагической сыпи, иногда с некрозами в области кожи голени было у 9, среднетяжелое — у 9, легкое течение — у 7 больных. У одного больного заболевание развивалось на фоне гипертонической болезни. Осложнение имело у одного больного, у которого заболевание протекало с явлениями панкреатита.

Нами исследованы следующие компоненты кининовой системы крови: суммарная эстеразная активность, прекалликреин и ингибиторная емкость плазмы крови по отношению к калликреину. В контрольных опытах определяли активность калликреина плазмы крови у 18 здоровых людей в возрасте от 23 до 40 лет.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, у больных геморрагическим васкулитом содержание отдельных компонентов кининовой системы по сравнению с нормой было следующее: прекалликреин — $47\pm6,3$ мкмоль гидролизованного субстрата в 1 ч на 1 мл плазмы

системы у больных геморрагическим васкулитом. Мы проводили сравнение между этими компонентами кининовой системы крови и тяжестью клинического течения геморрагического васкулита (табл. 2). У 9 больных с тяжелыми формами заболевания по сравнению с больными с легким течением (7) наблюдалось наибольшее снижение прекалликреина и ингибиторной емкости плазмы крови по отношению к калликреину. У 7 больных с легким течением заболевания прекалликреин составлял $71,8 \text{ мкмоль гидролизованного субстрата в } 1 \text{ ч на } 1 \text{ мл плазмы}$ при норме $74,7 \pm \pm 8,65 \text{ мкмоль/ч/мл}$, а у больных с тяжелым течением — $34,7 \text{ мкмоль/ч/мл}$. Ингибиторная емкость плазмы крови по отношению к калликреину у больных с легким течением заболевания составляла 0,65 усл. ед., а с тяжелым течением заболевания — 0,4 усл. ед. Суммарная эстеразная активность у тяжелобольных составляла $47,4 \text{ мкмоль/мл/ч}$ (норма $27,4 \pm 4,96 \text{ мкмоль/мл/ч}$), а у больных с легким течением заболевания — 55 мкмоль/мл/ч . Из этих данных видно, что у больных геморрагическим васкулитом с тяжелым течением заболевания наблюдается наиболее выраженная активация кининовой системы крови по сравнению с больными с легким течением заболевания. Активация кининовой системы у тяжелобольных идет за счет активации калликреина и понижения ингибиторной емкости плазмы крови по отношению к калликреину.

Полученные данные диктуют целесообразность изучения терапевтической эффективности антикининовых препаратов у больных геморрагическим васкулитом, что явится целью наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- П а с х и н а Т. С. — В кн.: Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов. Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1969, с. 317. — 2. П а с х и н а Т. С. — В кн.: Молекулярные основы патологии. Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1966, с. 123. — 3. П а с х и н а Т. С. — В кн.: Проблемы медицинской энзимологии, 1970, с. 97—100. — 4. К у л а г а В. В. Васкулиты кожи. Барнаул, 1976, с. 192. — 5. Л а т ы ш е в а В. В. — Вестн. дерм. и венер., 1973, № 1, с. 37—39. — 6. О л е ф и р е н к о В. Ф. Состояние кининоген-кининовой системы у больных экземой. Автореф. канд. дис. Харьков, 1973.

Поступила 15/X 1977 г.

THE ROLE OF BLOOD KININE SYSTEM IN PATHOGENESIS OF HEMORRHAGIC SYNDROME IN HEMORRHAGIC VASCULITIS

G. T. Bleyan, A. S. Pogosyan, M. A. Stepanyan, E. N. Osipova

R. O. Eolyan Institute of Hematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the Armenian SSR, Yerevan

Total esterase activity of blood plasma from healthy persons was equal to $27.4 \pm \pm 4.96 \text{ } \mu\text{M/ml/hr}$, activity of kallikrein — $74.4 \pm 8.65 \text{ } \mu\text{M}$ of hydrolysed substrate/hr/ml of blood plasma, inhibitory capacity of blood plasma towards kallikrein was $0.9 \pm 0.1 \text{ app. un.}$ Total esterase activity of blood plasma, reflecting the activity of trypsin-like enzymes and kallikrein, was distinctly increased in patients with hemorrhagic vasculitis as compared with control group; content of prekallikrein and the inhibitory capacity of blood plasma towards kallikrein were decreased. In patients with severe forms of hemorrhagic vasculitis the most pronounced activation of blood kinine system was observed due to decrease in content of kallikrein and in the inhibitory capacity of blood plasma towards kallikrein.

УДК 616.441-006.5-07:616.153:577.175.85]-074

В. П. Фесенко, А. К. Бабалич

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кафедра общей хирургии лечебного факультета Крымского медицинского института. Симферополь

Биологическим методом исследованы содержание брадикинина, кининогена и активность киназа в сыворотке крови больных с заболеваниями щитовидной железы, с неуцененными грыжами и у здоровых лиц. Все три компонента кининовой системы

значительно возрастают при тиреотоксикозе, что указывает на нарушение функции кининовой системы при данной патологии. Некоторые проявления заболевания (тахикардия, потливость и др.), вероятно, связаны с высоким уровнем свободных кининов. Операция на щитовидной железе оказывает благоприятное воздействие на изученные показатели кининовой системы.

В настоящее время кининовой системе придается важное значение как одному из звеньев регуляции различных функций организма [1—3]. Кинины принимают активное участие в развитии патологических изменений при ряде заболеваний, в том числе и требующих хирургического вмешательства: в патогенезе воспалительного процесса [4], демпинг-синдрома [5], ожогового шока [6], гнойных процессов в легких [7] и т. д. В то же время участие кининовой системы в патогенезе тиреотоксикоза почти не изучено. Имеются лишь отдельные указания на то, что при гипертиреозах возможно повышение активности кининазы [8], уровня протеиназ [9], кининогена плазмы крови в условиях экспериментального тиреотоксикоза [10]. Изменение содержания этих веществ при оперативном лечении зоба не изучено, поэтому нами предпринято исследование некоторых показателей кининовой системы при операциях на щитовидной железе.

Методика

Исследовано 112 больных эутиреоидным (49) и токсическим (63) зобом в возрасте от 20 до 63 лет. Женщин было 100 (89,3%), мужчин — 12 (10,7%). Контрольную группу составили здоровые люди (21) и лица с неущемленными грыжами (20).

У всех больных наряду с общеклиническим исследованием изучали биологическими методами содержание в крови свободного брадикинина, кининогена и активность кининазы при поступлении в клинику и через 1, 3 и 6 сут после операции.

Кининоген в сыворотке крови определяли по методу Диница [11] в модификации Т. С. Пасхиной [12]. Его содержание в крови здоровых лиц составило $3,82 \pm 0,25$ мкг-экв брадикинина на 1 мл.

Свободный брадикинин определяли по его действию на изолированный рог матки [13] в безбелковом фильтрате сыворотки крови. Кровь собирали с раствором щавелевой кислоты (конечная концентрация 0,004 М) и центрифугировали. Центрифугат осаждали 3,0 мл 10% ТХУ и вновь центрифугировали. Перед определением центрифугат нейтрализовали 0,05 н. NaOH и доводили до 10 мл 0,004 М щавелевой кислотой. У 21 здорового человека содержание брадикинина составило в среднем $2,1 \pm 0,3$ нг/мл.

При исследовании активности кининазы в сыворотке крови за основу был взят биологический метод М. С. Суровиной [14, 15]. В 4 силиконированные мерные пробирки вносили по 1,0 мл 0,05 М трис-буфера pH 7,5 и по 0,1 мл стандартного раствора брадикинина (10 мкг/мл). Одна пробирка служила контролем, во вторую вносится 0,02 мл, в третью — 0,05 мл и в четвертую — 0,07 мл сыворотки крови. После инкубации при 37°C в течение 10 мин пробы осаждали 0,3 мл 10% ТХУ и центрифугировали. Центрифугаты нейтрализовали NaOH и доводили до 2,0 мл 0,004 М щавелевой кислотой. Для определения результата исследования брали пробу, значение которой находилось на прямом участке стандартной кривой. Как правило, для этих целей служила проба, в которую внесено 0,05 мл сыворотки крови. Средний показатель у 21 здорового человека был $0,663 \pm 0,035$ мкг-экв инактивированного брадикинина в 1 мин на 1 мл сыворотки крови.

Результаты и обсуждение

Содержание кининогена в сыворотке крови больных зобом было достоверно повышено до оперативного вмешательства (табл. 1). При эутиреоидном зобе, который почти всегда был узловым (41) и реже — смешанным (8), оно составило $5,0 \pm 0,32$ мкг-экв брадикинина на 1 мл. Еще больше возрастало содержание кининогена в сыворотке крови больных тиреотоксикозом ($6,37 \pm 0,38$ мкг-экв брадикинина на 1 мл). Содержание кининогена зависит также от тяжести заболевания. Если при тиреотоксикозе легкой и средней тяжести оно было $6,02 \pm 0,36$ мкг-экв брадикинина на 1 мл, то при тяжелом — $7,83 \pm 1,16$ мкг-экв брадикинина на 1 мл. Анатомическая структура щитовидной железы при этом значения не имела. В контрольной группе лиц с неущемленными грыжами показатель мало отличался от такового у здоровых ($P > 0,1$).

Таблица 1

Показатели кининовой системы у здоровых и больных

| Обследованные | Исследованный показатель | Число обследо- ванных | Срок исследования | | | | | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|-------------------|-----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
| | | | до операции | | 1-е сутки после операции | | 3-и сутки после операции | | 6-е сутки после операции | |
| | | | $M \pm m$ | P | $M \pm m$ | P | $M \pm m$ | P | $M \pm m$ | P |
| Здоровые | Кининоген | 21 | $3,82 \pm 0,25$ | | | | | | | |
| | Брадикинин | 21 | $2,1 \pm 0,3$ | | | | | | | |
| | Кининаза | 21 | $0,663 \pm 0,025$ | | | | | | | |
| Больные эутирео- идным зобом | Кининоген | 49 | $5,0 \pm 0,32$ | $< 0,001$ | $6,18 \pm 0,42$ | $< 0,05$ | $5,88 \pm 0,37$ | $< 0,05$ | $5,7 \pm 0,38$ | $> 0,1$ |
| | Брадикинин | 17 | $4,0 \pm 1,0$ | $< 0,001$ | $5,6 \pm 1,3$ | $< 0,05$ | $5,1 \pm 1,7$ | $> 0,05$ | $2,5 \pm 0,9$ | $> 0,1$ |
| | Кининаза | 16 | $0,717 \pm 0,070$ | $> 0,1$ | $0,547 \pm 0,09$ | $> 0,1$ | $0,541 \pm 0,065$ | $> 0,05$ | $0,570 \pm 0,041$ | $> 0,05$ |
| Больные тиреоток- сическим зобом: легкой и средней тяжести тяжелым | Кининоген | 63 | $6,37 \pm 0,38$ | $< 0,001$ | $5,41 \pm 0,29$ | $< 0,05$ | $5,38 \pm 0,34$ | $> 0,05$ | $5,05 \pm 0,26$ | $< 0,01$ |
| | Брадикинин | 17 | $8,2 \pm 2,00$ | $< 0,01$ | $10,9 \pm 2,3$ | $< 0,01$ | $11,9 \pm 2,7$ | $< 0,01$ | $4,1 \pm 1,3$ | $> 0,1$ |
| | Кининаза | 17 | $1,03 \pm 0,079$ | $< 0,001$ | $0,738 \pm 0,075$ | $< 0,02$ | $0,757 \pm 0,080$ | $< 0,05$ | $0,814 \pm 0,086$ | $> 0,05$ |
| | Кининоген | 51 | $6,02 \pm 0,36$ | $< 0,001$ | $5,62 \pm 0,35$ | $> 0,1$ | $5,53 \pm 0,42$ | $> 0,1$ | $4,97 \pm 0,30$ | $< 0,05$ |
| | Брадикинин | 10 | $6,3 \pm 2,3$ | $< 0,05$ | $9,6 \pm 2,9$ | $< 0,02$ | $9,1 \pm 2,9$ | $< 0,05$ | $3,6 \pm 1,3$ | $> 0,1$ |
| | Кининаза | 10 | $0,925 \pm 0,112$ | $< 0,05$ | $0,792 \pm 0,115$ | $> 0,1$ | $0,829 \pm 0,128$ | $> 0,1$ | $0,808 \pm 0,119$ | $> 0,1$ |
| | Кининоген | 12 | $7,83 \pm 1,16$ | $< 0,01$ | $4,56 \pm 0,38$ | $< 0,02$ | $4,72 \pm 0,58$ | $< 0,05$ | $5,41 \pm 0,53$ | $< 0,05$ |
| | Брадикинин | 7 | $10,9 \pm 3,9$ | $< 0,05$ | $12,7 \pm 3,8$ | $< 0,05$ | $16,1 \pm 5,3$ | $< 0,05$ | $4,8 \pm 2,4$ | $> 0,1$ |
| | Кининаза | 7 | $1,187 \pm 0,077$ | $< 0,001$ | $0,661 \pm 0,072$ | $< 0,05$ | $0,653 \pm 0,050$ | $< 0,05$ | $0,822 \pm 0,124$ | $> 0,05$ |
| | Кининоген | 20 | $4,44 \pm 0,41$ | $> 0,1$ | $4,16 \pm 0,45$ | $> 0,1$ | $4,42 \pm 0,40$ | $> 0,5$ | $4,76 \pm 0,41$ | $> 0,1$ |
| | Брадикинин | 20 | $2,2 \pm 0,9$ | $> 0,5$ | $6,1 \pm 2,0$ | $> 0,05$ | $6,1 \pm 2,0$ | $> 0,05$ | $2,9 \pm 1,0$ | $> 0,1$ |
| | Кининаза | 20 | $0,614 \pm 0,040$ | $> 0,1$ | $0,503 \pm 0,047$ | $< 0,01$ | $0,577 \pm 0,071$ | $> 0,1$ | $0,580 \pm 0,064$ | $> 0,1$ |

Примечание. Содержание кининогена выражали в микрограмм-эквивалентах брадикинина на 1 мл, брадикинина — в нанограммах на 1 мл, кининазы — в микрограмм-эквивалентах инактивированного брадикинина в 1 мин на 1 мл.

Таблица 2

Содержание общего белка (в мг/100 мл) в крови здоровых и больных

| Обследованные | Число обследованных | Срок исследования | | | | | |
|--|---------------------|-------------------|---------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|
| | | до операции | | 1-е сутки после операции | | 3-и сутки после операции | |
| | | $M \pm m$ | P | $M \pm m$ | P | $M \pm m$ | P |
| Здоровые Больные эутиреоидным зобом Больные тиреотоксическим зобом: легкой и средней тяжести тяжелым | 17 | $7,42 \pm 0,04$ | $> 0,1$ | $7,41 \pm 0,11$ | $> 0,1$ | $7,36 \pm 0,12$ | $> 0,1$ |
| | 18 | $7,46 \pm 0,14$ | | | | | |
| | 38 | $7,25 \pm 0,11$ | $> 0,1$ | $7,16 \pm 0,10$ | $> 0,1$ | $7,10 \pm 0,12$ | $> 0,1$ |
| | 28 | $7,29 \pm 0,08$ | $> 0,1$ | $7,19 \pm 0,07$ | $> 0,1$ | $7,14 \pm 0,10$ | $> 0,1$ |
| | 10 | $7,17 \pm 0,20$ | $> 0,1$ | $7,08 \pm 0,19$ | $> 0,1$ | $6,99 \pm 0,18$ | $> 0,1$ |
| | | | | | | $7,38 \pm 0,14$ | $> 0,1$ |
| | | | | | | $7,18 \pm 0,10$ | $> 0,1$ |
| | | | | | | $7,24 \pm 0,08$ | $> 0,1$ |
| | | | | | | $7,03 \pm 0,17$ | $> 0,1$ |

Содержание общего белка в сыворотке крови больных зобом изменяется незначительно, что подтверждается и нашими данными (табл. 2).

Содержание свободных кииннов (брадикинина) в сыворотке крови при заболеваниях щитовидной железы также достоверно возрастает пропорционально тяжести тиреотоксикоза. Этот факт указывает на изменения в киинновой системе при повышении функции щитовидной железы. Проявлением этого у больных, возможно, является выраженная сосудисто-вегетативная реакция (гиперемия кожи, повышенная потливость, изменение сердечной деятельности и др.). Однако одновременно происходит также увеличение активности кииназы. При тяжелом тиреотоксикозе ее значения наиболее высоки ($1,18 \pm 0,077$ мкг-экв инаktivированного брадикинина в 1 мин на 1 мл сыворотки крови).

В послеоперационном периоде наступают значительные изменения в организме, вызванные операционной травмой, что должно, конечно, сказываться на состоянии киинновой системы.

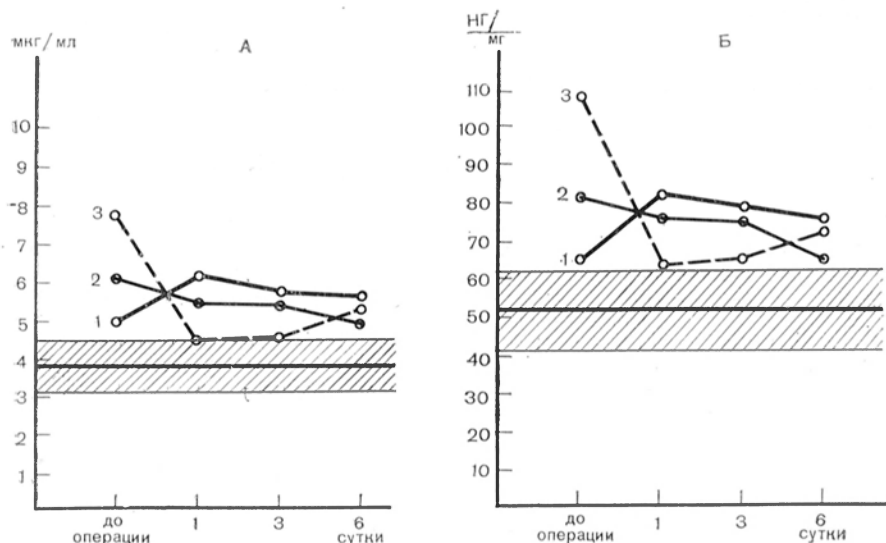
У лиц контрольной группы имелась незначительная тенденция к уменьшению содержания кииногена в крови в 1-е сутки после операции грыжесечения. Однако эти изменения были недостоверны ($P > 0,1$). Затем уровень кииногена несколько повышался к 3-м и 6-м суткам. Нужно отметить, что эта группа больных оперирована под местным обезболиванием. Оперативное вмешательство на щитовидной железе выполняли во всех случаях под общим обезболиванием. Однако колебания уровня кииногена зависели от функции железы и исходного его содержания в сыворотке крови. При эутиреоидном зобе в 1-е сутки после операции наступало достоверное ($P < 0,05$) увеличение содержания кииногена с постепенным его снижением к 3-м суткам и еще больше — к 6-м суткам, хотя конечное содержание было выше дооперационного уровня, как и у больных контрольной группы.

У лиц с тиреотоксикозом имелся другой характер изменений. Содержание кииногена постепенно снижалось в 1, 3 и 6-е сутки, однако степень снижения зависела от тяжести токсикоза. Наиболее выраженное снижение отмечено в 1-е сутки при тяжелом гипертоническом зобе ($4,56 \pm 0,38$ мкг-экв брадикинина на 1 мл) с некоторым повышением на 3-и и 6-е сутки. Это, возможно, связано с более глубокими гормональными нарушениями у этих лиц в послеоперационном периоде.

Изменения в содержании кининогена в послеоперационном периоде нельзя отнести за счет колебания уровня белка в крови (см. табл. 2), так как его содержание менялось незначительно ($P > 0,1$).

Анализ данных о содержании кининогена при пересчете на 1 мг белка (см. рисунок) указывает на абсолютное увеличение количества кининогена.

Содержание свободных кининов (брадикинин) в отличие от кининогена изменялось после операции однонаправленно (см. табл. 1), увеличиваясь как у больных контрольной группы, так и у лиц с эутиреоидным и тиреотоксическим зобом. К 6-м суткам наступало снижение активности



Содержание кининогена в сыворотке крови больных с заболеваниями щитовидной железы до и после операции.

А — кининоген (в мкг на 1 мл сыворотки крови); Б — кининоген (в нг на 1 мг белка). 1 — эутиреоидный зоб; 2 — легкий и средней тяжести тиреотоксикоз; 3 — тяжелый тиреотоксикоз. Заштрихованная часть — норма. По оси абсцисс — срок исследования (сутки после операции).

брадикинина. Это свидетельствует о нарушении функции кининовой системы, что, вероятно, поддерживает сосудистые реакции в области раны и во всем организме. По мере уменьшения альтерирующих и развития регенеративных процессов улучшается микроциркуляция, что отражается в изменении содержания брадикинина.

Динамика активности кининазы в послеоперационном периоде во всех группах больных имела одинаковое направление: отмечалось снижение активности этого фермента. Однако уменьшение активности кининазы было тем больше, чем тяжелее был тиреотоксикоз и выше ее дооперационный уровень (см. табл. 1). К 6-м суткам после операции активность фермента незначительно увеличивается.

Таким образом, повышенная функция щитовидной железы сопровождается повышением уровня изученных показателей кининовой системы со значительными изменениями ее в послеоперационном периоде. Остающиеся к моменту выписки больных нарушения доказывают необходимость дальнейшего лечения и наблюдения за ними.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Н. Кининовая система. Киев, 1977. — 2. Кузин М. И., Меньшиков В. В., Дудник В. Е. и др. — Хирургия, 1972, № 2, с. 116—119. — 3. Пасхина Т. С. — В кн.: Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов. М., 1969, с. 317—359. — 4. Гапонок П. Е. —

Пат. физиол., 1968, № 5, с. 81—87. — 5. Кузин М. И. и др. — Хирургия, 1974, № 4, с. 84—88. — 6. Пасхина Т. С. и др. — Вопр. мед. химии, 1972, № 2, с. 137—145. — 7. Ситковский Н. Б. и др. Ингибиторы протеолиза в хирургии детского возраста. Киев, 1977. — 8. Watanabe N., Abe K., Kitagai N. et al. — Tohoku J. exp. Med., 1966, v. 89, p. 383—387. — 9. Алифанов А. Т. — В кн.: Вопросы эндокринологии и обмена веществ. Владивосток, 1974, с. 55—57. — 10. Гусельников Б. П., Уразаева Э. В. — В кн.: Научная конф. физиологов, биохимиков и фармакологов Западно-Сибирского объединения. 5-я. Сборник материалов. Томск, 1973, с. 240—241. — 11. Diniz C. R. et al. — Nature, 1961, v. 192, p. 1194—1195. — 12. Пасхина Т. С. — В кн.: Проблемы медицинской энзимологии. М., 1970, с. 97—110. — 13. Пасхина Т. С., Гуликова О. М., Егорова Т. П. и др. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1968, т. 2, с. 205. — 14. Суровикина М. С. и др. — Сов. мед., 1972, № 12, с. 59—66. — 15. Суровикина М. С., Васильева Р. О. — Педиат. акуш. i гин., 1973, № 1, с. 11—12.

Поступила 15/X 1977 г.

SOME PATTERNS OF KININE SYSTEM IN IMPAIRMENTS OF THYROID GLAND

V. P. Fesenko, A. K. Babalich

Chair of General Surgery, Krimean Medical School, Simpheropol

Content of free bradikinin, kininogen and kininase activity were studied using biological methods in blood serum of 112 patients with goiter, of 20 patients with strangulated hernia and of 21 healthy person. The patterns studied were similar to normal value in patients with euthyroid goiter and strangulated hernia. Thyrotoxicosis (63 patients) was accompanied by increase in all the patterns studied and the alterations were most pronounced in severe form of the impairment. Content of kininogen and kininase activity were increased about 2-fold and bradikinin content — 5-fold. Content of free bradikinin was increased and kininase activity was decreased in all groups of patient within 1—3 days after the operation. Content of kininogen was increased in euthyroid goiter and decreased in thyrotoxic one. Patterns of kinine system trended to normalization within 6 days after the operation.

УДК 616.831-005.4-07:[616.36+616.74]-008.934.586.3

Л. Г. Огородникова

ВЛИЯНИЕ ИШЕМИИ МОЗГА НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ И МЫШЦАХ

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

Ишемия мозга у кроликов, вызванная односторонней перевязкой сонной артерии, приводила к накоплению гликогена в печени на протяжении 7 сут, а в мышцах — на протяжении 4 сут. К 7-м суткам концентрация гликогена в мышцах возвращалась к исходному уровню, а на 14-е сутки снижалась. Ишемия мозга животных, как правило, вызывала гипергликемию и приводила к снижению уровня инсулина в плазме.

При нарушении мозгового кровообращения у человека и при экспериментальной ишемии мозга у животных происходит нарушение углеводного обмена не только в мозге, но и в других органах. На это указывает тот факт, что инсульту, как правило, сопутствуют гипергликемия и циркуляторный ацидоз [1—7].

Настоящая работа посвящена определению содержания гликогена в печени и скелетных мышцах кроликов после односторонней перевязки сонной артерии. У оперированных животных определяли также уровень гликемии и содержание иммунореактивного инсулина (ИРИ) в плазме.

Методика

Исследование проводили на кроликах с начальной массой 2,5—3,2 кг. В опыте использовали накармлированных животных. Ишемию мозга вызывали односторонней перевязкой общей сонной артерии. Операцию производили под эфирным наркозом.

У оперированных кроликов определяли уровень гликемии ортотолуидиновым методом [8]. Одновременно исследовали концентрацию ИРИ в плазме крови радиоиммунологическим методом [9]. В основе этого метода лежит свойство некоторых полимеров стойко

сорбировать на своей поверхности иммуноглобулины. Пробирка из такого полимера с фиксированными на ней антителами способна извлекать антиген из налитого в нее раствора, при этом комплекс антиген — антитело после опорожнения пробирки остается на ее стенке. Определение гормона производилось в лаборатории эволюции эндокринных функций Л. П. Солтицкой.

Содержание гликогена в печени и скелетных мышцах определяли антроновым методом [10]. Материал для биохимического исследования брали в разные сроки после операции — от 1 до 14 сут. Животных забивали декапитацией, печень и мышцы замораживали в жидком кислороде.

Результаты и обсуждение

Уровень гликемии у кроликов снижался через 1 сут после операции. С 4-х по 10-е сутки наблюдалось увеличение содержания сахара в крови, а на 14-е сутки оно возвращалось к нормальному уровню (табл. 1).

Концентрация ИРИ в плазме кроликов снижалась с 1-х по 7-е сутки после перевязки сонной артерии, на 10-е сутки несколько повышалась (недостаточно) и к 14-м суткам достигала нормального уровня (см. табл. 1).

Содержание гликогена в печени кроликов увеличивалось в течение 1 нед после операции. В мышцах концентрация этого полисахарида также повышалась с 1-х по 4-е сутки после перевязки сонной артерии, к 7-м суткам возвращалась почти к исходному уровню и на 14-е сутки снижалась (табл. 2).

Исследования, посвященные изучению гормональной активности при ишемии мозга, вызванной инсультом, указывают на увеличение содержания в крови больных адреналина, глюкокортикоидов и гормонов щитовидной железы, т. е. на развитие «общего адаптационного синдрома» [11—15]. При этом повышается уровень глюкозы в крови [1—3]. Результаты, полученные нами, показали, что у кроликов после перевязки сонной артерии появляется гипергликемия, которая сохраняется в течение 4—10 сут после операции. При этом наблюдается снижение ИРИ в плазме. Уменьшение ИРИ в плазме происходило раньше, чем развивалась гипергликемия. Казалось бы, что в это время поджелудочная железа должна увеличивать выброс инсулина, поскольку показано, что в экстремальных ситуациях включаются как инсулярные, так и контринсулярные механизмы [11, 15, 16]. У млекопитающих и человека поджелудочная железа очень чутко реагирует на повышение гликемии усиленным выбросом инсулина и уровень этого гормона в крови отчетливо повышается [16]. У кроликов в условиях ишемии этого не происходит. При гипергликемии у животных не было обнаружено повышения в плазме концентрации ИРИ. Напротив, в этих условиях она, как правило, снижалась. Наиболее отчетливая гипергликемия была обнаружена на 4-е сутки после операции. Тогда же наблюдалось и наиболее выраженное снижение уровня ИРИ в плазме у кроликов. В первые сутки после операции содержание сахара в крови уменьшалось, хотя уровень ИРИ был уже сниженным. Это показывает, что поджелудочная железа реагирует на ишемическое воздействие быстрее, чем углеводы выбрасываются в кровь печенью.

Таблица 1

Влияние перевязки сонной артерии на гликемию и содержание иммунореактивного инсулина в плазме кроликов

| Время после операции, сут. | Содержание сахара, мг/100 мл | Концентрация инсулина, мкед/мл |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Интактные животные | $111 \pm 1,1$ (10) | $10,0 \pm 0,94$ (6) |
| 1 | $94 \pm 2,6$ (12)* | $6,5 \pm 1,44$ (4)* |
| 4 | $186 \pm 3,9$ (8)* | $6,4 \pm 1,13$ (7)* |
| 7 | $155 \pm 1,5$ (8)* | $8,8 \pm 1,62$ (6) |
| 10 | $144 \pm 2,5$ (8)* | $13,5 \pm 2,46$ (4) |
| 14 | $110 \pm 2,8$ (6) | $8,2 \pm 1,57$ |

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках указано число животных, использованных в опыте. Звездочкой отмечен достоверный эффект.

Таким образом, было показано, что уровень ИРИ снижается на короткий срок, в то время как изменение гликемии имеет более длительный характер.

Исследования гликемии у больных инсультом дали повод для заключения об изменении углеводной функции печени в этот период [1, 17].

Т а б л и ц а 2

Влияние перевязки сонной артерии на содержание гликогена (в мг/100 г) в печени и мышцах кроликов

| Время после операции, сут | Печень | Мышца |
|---------------------------|---------------|---------------|
| Интактные животные | 2220±184 (8) | 265±24,8 (10) |
| 1 | 3860±548 (4)* | 419±12,1 (4)* |
| 4 | 5080±464 (5)* | 455±44,3 (4)* |
| 7 | 2880±147 (4)* | 304±21,5 (4) |
| 10 | 2790±381 (5) | 145±23,7 (5)* |

Однако данные, полученные в клинике на людях, не могут дать точного представления о том, какие метаболические механизмы, контролируемые нервным и гормональным путем, включаются непосредственно в гипергликемический эффект при инсульте, поскольку для этого необходимо изучить не только кровь и экскреаты, но и тканевые процессы, что можно сделать лишь в эксперименте на животных. В этом направлении нами

было предпринято исследование, показавшее, что при пережатии сонной артерии в печени кроликов, начиная с 4 до 35 сут после операции, происходит увеличение активности глюкозо-6-фосфатазы, ответственной за выделение печени в кровь глюкозы. Мышцы не способны выделить глюкозу в кровяное русло, однако при расщеплении в них гликогена в кровь выделяется лактат, который затем утилизируется печенью и тем самым способствует накоплению в ней гликогена.

Данные литературы, полученные в других экспериментальных условиях, свидетельствуют, что, как правило, существует обратная коррелятивная связь между содержанием гликогена в печени, с одной стороны, и активностью глюкозо-6-фосфатазы, а также уровнем гликемии — с другой [18]. Нами, однако, было обнаружено, что, несмотря на гипергликемию, у кроликов в послеоперационном периоде концентрация гликогена не только не снижалась, но, наоборот, даже увеличивалась. Возможно, в условиях ишемии мозга у кроликов наряду с расходом гликогена в печени, о чем свидетельствует повышенный уровень сахара в крови, а также увеличение активности глюкозо-6-фосфатазы в печени в этот период, происходит и интенсивный синтез этого полисахарида, по-видимому, из углеводных источников. Увеличение концентрации гликогена при наличии гипергликемии объяснить затруднительно. Правда, существует точка зрения, что глюкозо-6-фосфатаза эндоплазматического ретикулаума клеток печени осуществляет в основном гидролитическую функцию. Глюкозо-6-фосфатаза ядер клеток является полифункциональным ферментом и катализирует как гидролиз, способствуя выделению глюкозы из клеток в кровяное русло, так и синтез глюкозо-6-фосфата, что приводит к накоплению гликогена в печени [19, 20]. Конечный эффект в наших условиях, по-видимому, зависит от того, какой из этих двух процессов преобладает.

Гликоген в печени может накапливаться и благодаря активации гликогенсинтазы, а также при замедлении деградации гликогена в результате ингибирования активности фосфорилазы. Синтез гликогена в печени может происходить и благодаря распаду гликогена в мышцах. Однако, как показано нами, этого не происходит, так как до 7-х суток после перевязки сонной артерии у животных наблюдается аккумуляция гликогена в мышцах. Только на 10-е сутки после операции гликоген в печени кроликов может пополняться за счет гликогена мышц, поскольку именно в этот срок происходит снижение содержания этого полисахарида в мышечной ткани.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что печень и скелетная мышца отвечают на воздействие легкой ишемии усилением синтеза гликогена, т. е. сходным образом. В дальнейшем концентрация гликогена в мышцах снижается. Гипергликемия в этих условиях обусловлена как усилением деградации гликогена в печени, о чем свидетельствует повышенная активность глюкозо-6-фосфатазы в этом органе, так и гормональными факторами, в частности снижением концентрации инсулина в крови. На основании определения ИРИ в плазме при ишемии мозга можно предположить изменение в этих условиях функции поджелудочной железы, так как в ответ на гипергликемию наблюдается извращенная реакция (снижение концентрации инсулина). Это нарушение связано, очевидно, с изменением глюкорепонторной функции β -клеток поджелудочной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Р. А. — Ж. невропатол. и психиатр., 1959, № 4, с. 446. —
2. Борисенко Р. И. — Там же, 1959, № 4, с. 452. — 3. Горбатенко А. Г. — Врач. дело, 1968, № 4, с. 122. — 4. Benzi G., Arrigoni E., Ferraga A. et al. — J. pharm. Sci., 1969, v. 58, p. 9. — 5. Briegleb J. B., Brown A. W., Excell B. J. et al. — Brain Res., 1969, v. 13, p. 68. — 6. Дирордиенко И. А. — В кн.: Физиология и патология нервной системы. Харьков, 1975, с. 37. — 7. Ищенко М. М., Весельский И. Ш., Лобанова Н. Д. — Врач. дело, 1975, № 7, с. 61. — 8. Dubowski K. M. — Clin. Chem., 1962, v. 8, p. 215. — 9. Лейбуш Б. Н. — Бюлл. экпер. биол., 1971, № 11, с. 89. — 10. Seifter S., Dayton B., Novic B. et al. — Arch. Biochem., 1950, v. 25, p. 191. — 11. Филина А. А., Яруллин Х. Х. — Клини. мед., 1964, № 9, с. 53. — 12. Шубич М. Г., Ашман А. А. — Ж. невропатол. и психиатр., 1965, № 1, с. 29. — 13. Красюк Е. А. — Там же, 1966, № 9, с. 1340. — 14. Максимук А. П. — Врач. дело, 1970, № 10, с. 97. — 15. Ищенко М. М., Весельский И. Ш., Коморовская Я. М. — Клини. мед., 1974, № 9, с. 70. — 16. Лейбсон Л. Г. Сахар крови. М.—Л., 1962, с. 203. — 17. Крыжановская И. И., Попова Е. В. Нейроэндокринная система и обмен веществ при недостаточности кровообращения. Киев, 1968, с. 7. — 18. Weber G., Singhal R. L., Srivastava S. K. — In: Advanc. Enzyme Regulat., 1965, v. 3, p. 43. — 19. Guderson H. M., Nordlie R. C. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1973, v. 52, p. 601. — 20. Nordlie R. C. — Trends. Biochem. Sci., 1976, v. 9, p. 199.

Поступила 15/X 1977 г.

EFFECT OF BRAIN ISCHEMIA ON CONTENT OF GLYCOGEN IN LIVER AND MUSCLE TISSUES

L. G. Ogorodnikova

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Leningrad

Ischemia of brain in rabbits, caused by unilateral ligation of arteria carotica, led to accumulation of glycogen in liver tissue within 7 days and in muscles — within 4 days. Concentration of glycogen in muscles returned to initial level within 7 days and within 14 days it was decreased. Brain ischemia of mammals was generally responsible for hyperglycemia and for decrease of insulin in blood plasma.

УДК 616.5-004.1-031.81-07:616-008.939.629-074

Д. А. Лебедев

ОБМЕН КОЛЛАГЕНА ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Институт ревматизма АМН СССР, Москва

Исследовали скорости биосинтеза, созревания и распада коллагена в коже больных системной склеродермией (ССД). Скорость биосинтеза коллагена у большинства больных увеличена в среднем в 3 раза по сравнению с нормой, а у отдельных лиц — в 4—6 раз. Скорость созревания коллагена при ССД увеличена в среднем в 2 раза. Содержание коллагена в коже при ССД снижено, а скорость его распада значительно превышает контроль.

Скорость биосинтеза коллагена не зависит от характера поражения кожи. Скорость созревания коллагена по мере развития склеродермического поражения возрастает,

а скорость его распада, напротив, снижается. При хроническом и быстропрогрессирующем течении ССД скорость биосинтеза коллагена повышена в наибольшей степени. При подостром течении она значительно ниже, чем при хроническом и быстропрогрессирующем, но выше, чем в норме. При подостром течении ССД и в индурированной коже процессы биосинтеза и созревания коллагена связаны, сопряжены. В видимо непораженной коже при быстропрогрессирующем и хроническом течении ССД эти процессы разобщены.

Системная склеродермия (ССД) — заболевание из группы диффузных болезней соединительной ткани с характерным прогрессирующим фиброзом и сосудистой патологией, лежащими в основе поражения кожи, суставов, внутренних органов — сердца, легких, пищеварительного тракта, почек и др.

Среди современных концепций возникновения и развития ССД заслуживает внимания представление, согласно которому решающую роль в генезе фиброобразования играет нарушение обмена основного белка соединительной ткани коллагена [1]. Результаты биохимических исследований подтвердили значение коллагена в патогенезе этого заболевания. У многих больных наблюдалось усиление биосинтеза коллагена [2—6], изменение его концентрации в коже [2, 7—11], соотношения растворимых и нерастворимых фракций коллагена [2, 12—14], изменения аминокислотного состава этого белка [15], связей, возникающих между молекулами коллагена при образовании фибрилл [6, 14, 16].

Однако эти изменения у разных больных выражены в различной степени, а в некоторых исследованиях не были обнаружены совсем. Противоречия данных литературы, вероятно, обусловлены тем, что характер и выраженность биохимических изменений при ССД в значительной степени зависят от течения заболевания в целом и степени поражения исследуемой ткани. В большинстве опубликованных работ изучение обмена коллагена у больных ССД проводилось без учета клинической характеристики и характера поражения кожи. Кроме того, мы не обнаружили работ, в которых на достаточно большом материале оценивались бы одновременно различные этапы метаболизма коллагена — скорость его биосинтеза, созревания и распада.

Остается недостаточно освещенным вопрос о вовлеченности в патологический процесс внешне непораженной кожи больных ССД.

Поскольку между вариантами течения ССД имеются существенные различия, то можно предполагать, что биохимические нарушения, лежащие в их основе, гетерогенны.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение обмена коллагена при ССД и сопоставление полученных результатов с характером поражения и различными вариантами течения болезни.

М е т о д и к а

Было исследовано 22 биоптата кожи от 21 больного ССД (6 мужчин и 15 женщин в возрасте от 17 до 57 лет), находившихся на лечении в клиническом отделении Института ревматизма АМН СССР. У 8 больных отмечалось острое быстропрогрессирующее, у 6 — подострое и у 7 — хроническое течение болезни. Контролем служили 10 биоптатов кожи от 8 лиц, не имевших каких-либо признаков заболевания соединительной ткани.

Биоптаты кожи больных ССД брали из предплечья в участках без видимых изменений, с плотным отеком и индуриацией.

В работе использовали ^{14}C -пролин с удельной радиоактивностью 125 мкКи/ммоль (ЧССР), дауэкс 50W×8 (200—400 меш) («Serga», Швеция). Остальные реактивы были отечественного производства категории х. ч. и ч. д. а.

Из биоптатов осторожно удаляли подкожно-жировую клетчатку, кожу взвешивали и разрезали микротомом на кусочки равной толщины (0,5 мм). Срезы кожи помещали в круглодонные колбы емкостью 20 мл с 4 мл инкубационной среды и инкубировали 10 ч при непрерывном встряхивании при 37°C.

Биоптаты отделяли от инкубационной среды на стеклянном фильтре и промывали 20 мл дистиллированной воды. Инкубационную среду и фильтрат объединяли и подвергали анализу. В дальнейшем диализат объединяли с фракцией растворимого коллагена. Отмытые образцы кожи переносили в пробирку и, заморозив с 0,5 мл физиологического раствора,

лиофилизировали. Высушенный образец взвешивали и, зная вес оставшейся соли, рассчитывали содержание воды в образце и его сухой вес.

Гомогенизацию кожи проводили в гомогенизаторе при 140 000 об/мин при охлаждении, экстрагирующий раствор содержал 0,45 М NaCl в 0,05 М трис-буфере pH 7,4.

Экстракцию коллагена проводили 3 раза на холоду при встряхивании. Полученный экстракт диализировали и объединяли с отдиализованной инкубационной средой. К полученному раствору приливали равный объем 12 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.

Аминокислоты разделяли хроматографически на колонках с дауэксом 50W×8 (200—400 меш). Фракцию оксипролина собирали в фарфоровую чашку, выпаривали на водяной бане, растворяли в небольшом объеме воды, после чего отбирали пробы для определения содержания общего и радиоактивного оксипролина. Содержание оксипролина определяли методом Бергмана и Локсли [17], радиоактивность его — с помощью сцинтилляционного счетчика. Истинное число распадов в 1 мин вычисляли методом отношения каналов.

Суммарная радиоактивность оксипролина в растворимом и нерастворимом коллагене служила показателем интенсивности его биосинтеза. Скорость созревания коллагена оценивали по радиоактивности оксипролина нерастворимой фракции коллагена. Сопоставление концентрации коллагена в коже и скорости его биосинтеза позволило судить об интенсивности распада коллагена в биоптате. Подробное изложение методов исследования в [7].

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования выявлены отчетливые нарушения в обмене коллагена при ССД и определенная зависимость этих нарушений от характера поражения кожи и различного течения заболевания (табл. 1 и 2).

У большинства больных скорость биосинтеза коллагена увеличена в среднем в 3 раза, а у отдельных лиц — в 4—6 раз. Скорость созревания коллагена увеличена в среднем в 2 раза. Концентрация коллагена в коже при ССД значительно колеблется в зависимости от характера поражения кожи. В среднем у больных ССД она снижена, хотя это снижение статистически недостоверно. Тем не менее, учитывая высокий уровень биосинтеза коллагена и тенденцию к снижению его концентрации в коже можно заключить, что скорость распада коллагена при ССД повышена. Таким образом, при ССД наблюдается усиление всех процессов обмена коллагена. Увеличение скорости биосинтеза в 3 раза, а скорости созревания только в 2 раза позволяет предположить, что большая часть избыточного коллагена подвергается деструкции не созревая.

Сравнение скорости биосинтеза коллагена в разных участках кожи показало, что этот процесс практически не зависит от степени поражения кожи. В участках видимо непораженной кожи, в стадии плотного отека и индурации наблюдается как самый высокий, так и относительно низкий уровень биосинтеза коллагена. Средние значения скорости биосинтеза в этих группах больных значительно превышают норму и близки между собой. Этот вывод был подтвержден результатом исследования аутопсий кожи одного и того же человека, взятых из участков видимо непораженной кожи и индурации (см. табл. 1, наблюдения № 10 и 14). Скорость биосинтеза коллагена в этих участках была практически одинакова. Приведенные факты подтверждают представление о ССД как о заболевании, поражающем соединительную ткань всего организма в целом.

В отличие от синтеза коллагена скорость его созревания меняется по мере развития кожного поражения. В видимо непораженной коже она превышает контроль незначительно (в 1,5 раза), в то время как в отечной коже она превышает норму в 2, а при индурации — в 3 раза.

Приведенные данные показывают, что в видимо непораженной коже, несмотря на интенсивный биосинтез коллагена, скорость его созревания близка к норме, в то время как при индурации она существенно изменяется. Следовательно, уже в видимо непораженной коже больных ССД имеется отклонение синтеза коллагена от нормы, в то время как переход

к фиброзному поражению кожи сопровождается существенным изменением скорости созревания коллагена.

Концентрация коллагена в индуративной коже близка к норме. В отечной же и в видимо непораженной коже она снижена соответственно в 1,5 и 2 раза. Снижение концентрации коллагена в видимо непоражен-

Т а б л и ц а 1

Обмен коллагена в коже больных ССД

| № наблюдения | Течение ССД | Характер поражения кожи | Скорость биосинтеза коллагена | Скорость созревания коллагена | Содержание коллагена, % |
|--------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 1 | Быстро прогрессирующее | Отек | 2020 | 151 | 56 |
| 2 | | Индурация | 1334 | 129 | 58 |
| 3 | | | 1411 | 233 | 37 |
| 4 | | | 1381 | 175 | 35 |
| 5 | | | 1218 | 218 | 70 |
| 6 | | | 1120 | 292 | 36 |
| 7 | | | 861 | 273 | 50 |
| 8 | | | 670 | 184 | |
| 9 | Подострое | Видимо непораженная | 751 | 189 | 27 |
| 10 | | Отек | 634 | 160 | 32 |
| 11 | | | 1215 | 484 | 34 |
| 12 | | | 1114 | 329 | 37 |
| 13 | | Индурация | 656 | 266 | 23 |
| 14 | | | 587 | 111 | 33 |
| 15 | | | | | 67 |
| 16 | Хроническое | Видимо непораженная | 2451 | 281 | 30 |
| 17 | | Отек | 1617 | 187 | 33 |
| 18 | | | 675 | 96 | 11 |
| 19 | | | 2367 | 103 | 32 |
| 20 | | | 2864 | 568 | 70 |
| 21 | | | 2811 | 759 | 56 |
| 22 | | | 2017 | 373 | 67 |
| 23 | Контроль | | 879 | 321 | 45 |
| 24 | | | 756 | 197 | 49 |
| 25 | | | 413 | 137 | 35 |
| 26 | | | 354 | 78 | 50 |
| 27 | | | 338 | 58 | 49 |
| 28 | | | 260 | 48 | 64 |
| 29 | | | 253 | 56 | 65 |
| 30 | | | 222 | 40 | 57 |

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 содержание коллагена выражено в процентах к сухому весу кожи. Скорость биосинтеза коллагена определена по радиоактивности оксипролина растворимой и нерастворимой фракций коллагена и выражена в распадах в 1 мин на 10 мг сухого веса кожи. Скорость созревания коллагена определена по радиоактивности оксипролина нерастворимой фракции коллагена и выражена в распадах в 1 мин на 10 мг сухого веса кожи.

ной коже почти в 2 раза на фоне увеличения скорости его биосинтеза в 2,5 раза свидетельствует о том, что в этом участке кожи интенсивность деструкции коллагена максимальна. Поскольку содержание коллагена при индурации возрастает в 2 раза, а скорость биосинтеза остается такой же, как в видимо непораженной коже, то можно заключить, что интенсивность дегградации коллагена при индурации снижается.

Таким образом, по мере развития склеродермического поражения распад коллагена замедляется. Эта закономерность согласуется с данными

Бради [18], который обнаружил снижение активности коллагеназы в пораженных участках кожи больных ССД.

Известно, что при ССД повышается экскреция оксипролина с мочой, что свидетельствует, в частности, об усилении распада коллагена [19]. В то же время активность коллагеназы в непораженной коже при ССД не изменена, а в пораженных участках даже снижена [18]. Если допустить,

Т а б л и ц а 2

Усредненные данные по обмену коллагена

| Характеристика групп | Скорость биосинтеза | Скорость созревания | Содержание коллагена, % |
|--|---------------------|---------------------|-------------------------|
| Варианты течения ССД: | | | |
| ССД (I) | 1418±690 | 264±166 | 41,3±16,4 |
| быстро прогрессирующее (II) | 1253±404 | 207±57 | 48,8±13 |
| подострое (III) | 830±269 | 256±136 | 36±14 |
| хроническое (IV) | 2114±770 | 338±249 | 42,7±22 |
| Состояние кожи: | | | |
| видимо непораженная (V) | 1125±796 | 183±67 | 26,6±8,1 |
| с плотным отеком (VI) | 1450±630 | 244±146 | 40±13,9 |
| индурация (VII) | 1418±680 | 264±166 | 42,8±17,4 |
| Контроль (VIII) | 463±246 | 118±96 | 51,7±6,5 |
| Достоверность различий между группами: | | | |
| I и VIII | $P<0,001$ | $P<0,05$ | ст. н. д. |
| II и VIII | $P<0,001$ | | |
| III и VIII | $P<0,02$ | | |
| IV и VIII | $P<0,001$ | | |
| V и VIII | | ст. н. д. | $P<0,001$ |
| VI и VIII | | $P<0,02$ | ст. н. д. |
| V и VII | | $P<0,1$ | $P<0,01$ |

П р и м е ч а н и е. ст. н. д. — статистически недостоверно.

что при ССД распад коллагена происходит не за счет увеличения концентрации коллагеназы, а за счет увеличения концентрации растворимого коллагена, который значительно легче подвергается ферментативной деструкции, то это видимое противоречие легко объяснимо.

Из того факта, что в видимо непораженной коже снижается также концентрация нерастворимого коллагена на фоне достаточно интенсивного его биосинтеза, следует, что процесс деструкции захватывает и нерастворимый коллаген. Возможно, это происходит не за счет увеличения активности коллагеназы, а за счет внутриклеточного переваривания коллагеновых структур фиброкластами. Об этом свидетельствуют исследования Г. И. Яковлевой и соавт. [21], в которых было показано, что количество фиброкластов в видимо непораженной коже больных ССД значительно превышает норму, а в коже с индуративными изменениями их количество близко к норме.

Содержание воды в коже при плотном отеке (74,2 %) и индурации (72,5 %) статистически достоверно превышает ее количество в видимо непораженной коже (68,0 %) и в коже здоровых лиц (68,6 %).

Такое увеличение содержания воды в пораженных участках кожи может быть вызвано изменением соотношения между количеством сульфатированных протеогликанов и полимерного коллагена.

Сопоставляя данные по обмену коллагена при различных вариантах течения ССД, следует отметить, что самая высокая скорость биосинтеза наблюдается при хроническом и быстро прогрессирующем течении заболе-

вания (в среднем соответственно в 4,6 и 2,7 раза выше нормы). При подостром течении она превышает норму лишь в 1,8 раза (см. табл. 2).

Увеличение скорости биосинтеза коллагена в видимо непораженной коже, особенно при хроническом течении ССД, при котором фиброзное поражение органов и тканей значительно отстоит по времени от начала заболевания, может указывать на то, что обмен коллагена при ССД нарушен уже на стадии болезни, предшествующей фиброзу.

Повышенная скорость биосинтеза коллагена в сочетании со снижением его концентрации в коже свидетельствует о значительных деструктивных процессах при всех вариантах болезни.

При одновременном сопоставлении скорости созревания коллагена со скоростью его биосинтеза при различной степени поражения кожи и разных вариантах течения ССД был выявлен ряд закономерностей. Так, обнаружено, что в норме созревание коллагена увеличивается в определенном соответствии с увеличением скорости его биосинтеза.

При быстро прогрессирующем и хроническом течении его скорость созревания в биоптатах, взятых из участков кожи с индурацией, возрастает приблизительно так же, как и в коже здоровых людей, несмотря на значительное усиление биосинтеза коллагена. В норме биосинтез коллагена превышает скорость его созревания в среднем в 4,3 раза, при индурации — также в 4,3 раза. Видимо, в этих случаях процессы биосинтеза и созревания коллагена сопряжены.

В видимо непораженной коже и в области плотного отека при тех же вариантах течения ССД созревание коллагена значительно отстает от его биосинтеза. В среднем лишь $1/10$ новосинтезированного коллагена переходит в нерастворимую форму (в отдельных случаях, например в наблюдении № 19, скорость биосинтеза превышала скорость созревания в 23 раза). Такое разобщение этих процессов обмена коллагена можно рассматривать как адаптацию организма к патологически высокой скорости биосинтеза коллагена.

Отличительной чертой подострого течения заболевания является ускорение созревания коллагена на фоне сравнительно невысокой скорости его биосинтеза на всех стадиях поражения кожи. В этой группе больных отношение скорости биосинтеза коллагена к скорости созревания ниже нормы и равно 3.

Полученные данные выявили гетерогенность молекулярных механизмов повреждения при различных вариантах течения ССД. Поскольку наличие такой гетерогенности осложняет проведение исследований и интерпретацию полученных данных, то настоящая работа является попыткой более глубокого поиска конкретных механизмов патогенеза ССД. Проведенная работа может дать основание для более полной классификации вариантов течения ССД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусева Н. Г. Системная склеродермия. М., 1975.
2. Laitinen O., Uitto J., Hannuksela M. et al. — Ann. clin. Res., 1963, v. 1, p. 64.
3. Uitto J., Halme J., Hannuksela M. et al. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1963, v. 23, p. 241.
4. Uitto J., Helin P., Rasmussen O. et al. — Ann. clin. Res., 1970, v. 2, p. 228.
5. Keiser H. R., Stein H. D., Sjoerdsma A. — Arch. Derm., 1971, v. 104, p. 57.
6. Herbert C. M., Jayson M. J. V., Landberg K. A. et al. — Lancet, 1974, v. 1, p. 187.
7. Korting G. W., Holzmann H., Kühn K. — Klin. Wschr., 1964, Bd 42, S. 247.
8. Neldner K. H., Jones J. D., Winkelmann R. K. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1966, v. 122, p. 39.
9. Blumenkrantz N., Ullman S., Asbae-Hansen G. — Acta derm. - venereol. (Stockh.), 1976, v. 56, p. 93.
10. Black M. M., Bottoms E., Shuster S. — Brit. J. Derm., 1970, v. 83, p. 552.
11. Rodnan G. P. — In: La Scleroderma. Ed. F. Delbarre. Paris, 1972, p. 271.
12. Laitinen O., Uitto J., Hannuksela H. et al. — Ann. clin. Res., 1969, v. 1, p. 64.
13. Uitto J., Ohlenschläger K., Lerenzen J. B. — Clin. chim. Acta, 1971, v. 31, p. 13.
14. Zimmermann B. K., Balda B. R. — Arch. derm. Forsch., 1972, Bd 243,

S. 357. — 15. Gire M. G., Puserico A., Valpin D. — Connect. Tissue Res., 1974, v. 2, p. 309. — 16. Bashey R. I., Holpern S., Stephens R. E. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1975, v. 62, p. 303. — 17. Bergman G., Oxley R. — Analyt. Chem., 1963, v. 35, p. 1961. — 18. Brady A. H. — J. clin. Invest., 1975, v. 56, p. 1175. — 19. Kivirikko K. J. — Int. Rev. Connect. Tissue Res., 1970, v. 5, p. 93. — 20. Гусева Н. Г., Кристман А. Н. — Сов. мед., 1972, № 9, с. 19. — 21. Яковлева Г. И., Мульдияров П. Я., Гусева Н. Г. и др. — Арх. пат., 1975, № 3, с. 32.

Поступила 18/XI 1977 г.

METABOLISM OF COLLAGEN IN SYSTEMIC SCLERODERMIA

D. A. Lebedev

Institute of Rheumatism, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Rates of biosynthesis, maturation and degradation of collagen were studied in skin of patients with systemic scleroderma. The rate of collagen biosynthesis was increased about 3-fold in most patients and in several persons — increased 4—6-fold. Collagen maturation was approximately twice increased in systemic scleroderma. Content of collagen was decreased in skin of the patients and the rate of collagen degradation exceeded distinctly that of controls. The rate of collagen biosynthesis did not depend on the type of skin impairment. With development of sclerodermic disease maturation of collagen was increased and the rate of its degradation was, by contrast, decreased. The rate of collagen biosynthesis was the highest in chronic and progressive forms of scleroderma. In subacute scleroderma the rate of collagen biosynthesis was decreased as compared with chronic and progressive forms of the disease but it was higher than in normal state. Processes of biosynthesis and maturation of collagen were coupled, related to each other in subacute scleroderma and in indurative skin. These processes were uncoupled in visually unimpaired skin under progressive and chronic scleroderma.

УДК 577.161.11.02:577.125.33

А. И. Деев, Т. В. Еремина, В. Б. Спиричев

ВЛИЯНИЕ РЕТИНОЛА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

Институт питания АМН СССР, Москва

Исследовано влияние ретинола на кинетику перекисного окисления в липосомах и в фосфолипидов желтков куриных яиц. Перекисное окисление инициировали ионами Fe^{2+} , степень липопероксидации оценивали по тесту с 2-тиобарбитуровой кислотой. Ретинол обладал выраженным антиоксидантным действием при концентрациях в мембране более 1 мол. % и небольшим прооксидантным действием при меньших концентрациях. Антиоксидантный эффект ретинола зависел от температуры.

Специфическая функция ретинола в организме связана с его участием в форме ретинилфосфата в синтезе гликолипидов и гликопротеидов клеточных мембран [1, 2]. Наряду с этим ретинол оказывает многостороннее действие на структуру и функциональную активность клеточных мембран: их стабильность [3, 4], активность мембраносвязанных ферментов [5], кинетику перекисного окисления мембранных фосфолипидов [6]. Первичный механизм этих эффектов ретинола остается невыясненным. Предполагается, что лабилизирующее действие ретинола на мембраны связано с инициацией в мембране процессов перекисного окисления [7]. Однако, с другой стороны, в ряде работ был показан антиоксидантный эффект ретинола на процессы окисления липидов в микросомах [6, 8] и митохондриях [9]. Не исключена возможность, что в зависимости от дозы или каких-либо других условий ретинол может выступать в качестве как антиоксиданта, так и прооксиданта. Мы попытались исследовать эту возможность, используя модельные фосфолипидные мембраны-липосомы.

Методика

Фосфолипиды экстрагировали из желтков куриных яиц [10]. Концентрацию фосфолипидов определяли по фосфору [11]. Средний молекулярный вес фосфолипидов полагали равным 750. Липосомы получали путем впрыскивания этанольного раствора фосфолипидов

в буферный раствор [12]. Этанол из суспензии удаляли диализом. В качестве буферного раствора использовали 0,15 М NaCl — 0,01 М трис-HCl pH 7,5.

Перекисное окисление в суспензии инициировали добавлением 3 мкМ ионов Fe^{2+} и 230 мкМ аскорбата [13]. В отобранных пробах перекисное окисление останавливали добавлением 1 мМ ЭДТА. Степень липопероксидации оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), количество которого определяли по тесту с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [14]. Содержание ТБК-активных продуктов пересчитывали в эквиваленты МДА, принимая его молярную экстинкцию (E_{532}) равной $1,56 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [7]. Во избежание автоокисления липосом при инкубации в 0,5% раствор ТБК добавляли в качестве антиоксиданта 1 мМ 2-нафтол. В качестве оценочного параметра, характеризующего про- и антиоксидантные свойства ретинола, было выбрано время (τ), за которое достигается половина максимального уровня липопероксидации. За максимальный уровень липопероксидации

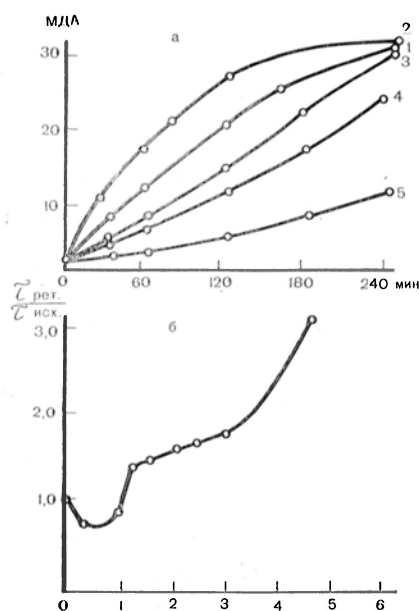


Рис. 1. Влияние различных концентраций ретинола на перекисное окисление в липосомах.

Концентрация фосфолипидов 670 мкМ, FeCl_2 3,0 мкМ, аскорбата 230 мкМ, температура среды 21°C . а — кинетика липопероксидации при концентрациях ретинола: 0,0 (1), 1 мкМ (2), 10 мкМ (3), 20 мкМ (4), 30 мкМ (5). По оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — концентрация МДА (в мкмоль на 1 мг липидов); б — относительная эффективность различных доз ретинола. По оси абсцисс — концентрация ретинола (в моль ретинола на 100 моль фосфолипидов); по оси ординат — отношение $\tau_{\text{рет}}$ и $\tau_{\text{исх}}$. τ — время, за которое достигается половина максимального уровня липопероксидации; «исх» и «рет» относятся соответственно к исходным липосомам и липосомам, содержащим ретинол.

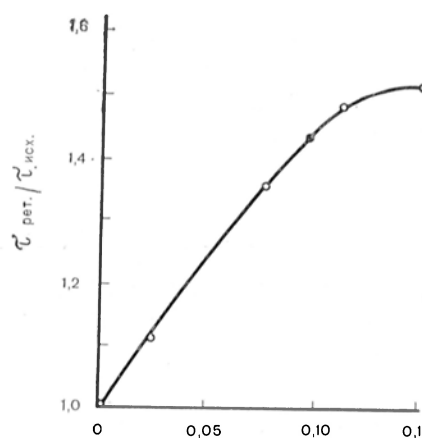


Рис. 2. Сравнение антиоксидантных свойств ионола и ретинола.

Концентрация фосфолипидов, FeCl_2 , аскорбата и температура среды те же, что на рис. 1. Светлые кружки — ионол; темный кружок — ретинол (1,5 моль ретинола на 100 моль фосфолипидов). По оси абсцисс — концентрация ионола (в моль ионола на 100 моль фосфолипидов); по оси ординат — отношение $\tau_{\text{рет}}$ к $\tau_{\text{исх}}$.

принято количество МДА, которое накапливается в исходных липосомах через 4 ч после инициации перекисного окисления.

Ретинол получали омылением ретинилацетата [15], степень чистоты полученных препаратов контролировали хроматографически [16]. Концентрацию ретинола оценивали методом прямой спектрофотометрии по его поглощению в этаноле при 328 нм [17]. Ретинол вносили в суспензию липосом в виде спиртового раствора ретинола. Концентрации этанола в опытной и контрольной пробах были одинаковы и не превышали 1%.

Результаты и обсуждение

Липосомы, в которых инициируется перекисное окисление, представляют собой удобную и стабильную тест-систему, пригодную для оценки про- и антиоксидантных свойств различных мембранотропных соединений, действующих непосредственно на липидную часть мембраны. Добавление ретинола к суспензии липосом изменяло кинетику их липопероксидации (рис. 1, а). При этом в зависимости от концентрации ретинола его влияние на скорость перекисного окисления было различным. В низких concentra-

циях (0,15 моль ретинола на 100 моль фосфолипидов) ретинол несколько ускорял процесс перекисного окисления фосфолипидов, а в концентрациях более 1,0 моль на 100 моль фосфолипидов он давал антиоксидантный эффект (рис. 1, б).

Антиоксидантный эффект ретинола был сопоставлен в данной системе с действием хорошо изученного синтетического антиоксиданта 4-диметил-2,6-ди-трет-бутилфенола (ионола). Ретинол в концентрации 1,5 моль.% вызывал такое же замедление скорости липопероксидации, как и 0,10 мол.% ионола (рис. 2). Таким образом, в данной системе эффективность ретинола как антиоксиданта была на порядок ниже, чем ионола.

Необходимо отметить, что накопление МДА в суспензии липосом обусловлено только окислением ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов. Аутоокисление самого ретинола в данном диапазоне концентраций, как было показано в контрольных опытах, не вызывает заметного образования ТБК-активных продуктов.

Прооксидантный эффект ретинола, обнаруживаемый при его низких концентрациях в мембране, по-видимому, связан с аутоокислением ретинола, ведущим к образованию свободных радикалов [18] и других продуктов, способных инициировать перекисное окисление фосфолипидов.

Антиоксидантное действие относительно высоких концентраций ретинола может быть обусловлено рядом причин. Во-первых, возможна конкуренция за инициаторы свободно-радикального окисления между молекулами ретинола и жирных кислот фосфолипидов. Однако эта возможность представляется маловероятной, так как ретинол дает выраженный антиоксидантный эффект уже при соотношении 1 моль ретинола на 140 моль жирнокислотных остатков. Даже если ретинол локализуется в областях мембраны, содержащих повышенное количество ненасыщенных жирных кислот, его антиоксидантное действие трудно объяснить только конкуренцией за инициаторы свободно-радикального окисления. Во-вторых, нельзя исключить возможность, что встраивание ретинола в мембрану изменяет ее структурные параметры, влияющие на кинетику липоперокисления. В-третьих, возможно, что молекула ретинола или образующиеся из нее продукты обладают антирадикальными свойствами.

Для выяснения возможного механизма антиоксидантного действия ретинола представляло интерес изучить температурную зависимость этого эффекта. Как известно, с повышением температуры в мембране возрастает площадь жидкокристаллических областей и подвижность фосфолипидов [19]. Из рис. 3 видно, что антиоксидантный эффект ретинола усиливается с повышением температуры в диапазоне 10—25°C. Дальнейшее увеличение температуры до 37°C слабо влияет на антиоксидантные свойства ретинола. Температурная зависимость подобного рода может свидетельствовать в пользу того, что антиоксидантные свойства ретинола зависят от его подвижности в фосфолипидной части биологических мембран.

Обнаруженный факт двоякого действия ретинола в зависимости от его концентрации может быть использован для объяснения противоречивых данных различных авторов, обнаруживавших в зависимости от условий эксперимента наличие у ретинола анти- [8, 9] или прооксидантного действия [7, 18]. Полученные данные дают основание считать, что ретинол в зависимости от его концентрации в фосфолипидной фазе биологических мем-

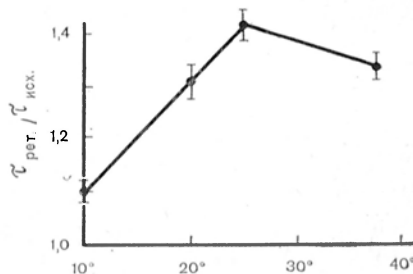


Рис. 3. Влияние температуры на антиоксидантный эффект ретинола.

Концентрация ретинола 1,5 моль ретинола на 100 моль фосфолипидов, концентрации фосфолипидов, FeCl_2 и аскорбата те же, что на рис. 1.

По оси абсцисс — температура среды инкубации (°C); по оси ординат — отношение $\tau_{\text{рет}}$ к $\tau_{\text{исх}}$.

бран действительно может дать про- или антиоксидантный эффект. Способность ретинола в низких концентрациях ускорять перекисное окисление липидов может играть определенную роль в его мембранотоксическом действии, в частности гемолитическом [4]. Наличие у ретинола антиоксидантных свойств в модельной фосфолипидной системе согласуется с данными о способности ретинола тормозить перекисное окисление в микросомах печени крыс при его добавлении *in vitro* [6] и при введении животным высоких доз этого витамина [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. De Luca L., Wolf G. — *Z. Vitaminforsch.*, 1970, Bd 40, S. 284—289. —
2. Peterson P. A., Nilson S. F., Ostbery L. et al. — *Vitam. a. Hormon.*, 1974, v. 32, p. 181—184. — 3. Wirtz H., Westfall S. S. — *Biochim. biophys. Acta*, 1974, v. 332, p. 131—135. — 4. Dingle J. T., Lucy I. A. — *Biol. Rev.*, 1965, v. 40, p. 422—461. — 5. Pokrovsky A. A., Kon I. Ja., Natanson A. O. — *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 1972, v. 42, p. 253—263. — 6. Покровский А. А., Лашиева Н. В., Конь И. Я. — Докл. АН СССР, 1974, т. 217, № 6, с. 1435—1438. — 7. Владимиров Ю. А., Арчаков А. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972, с. 210—211, 242. — 8. Pokrovsky A. A., Lashneva N. V., Kon I. Ja. — *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 1974, v. 44, p. 477—486. — 9. Hunter F. E., Scott A., Hoffsten P. E. et al. — *J. biol. Chem.*, 1964, v. 239, с. 604—613. — 10. Folch I., Lees M., Sloane-Stanley G. H. — *Ibid.*, 1957, v. 226, p. 497—509. — 11. Gegeasch E., Deuticke B. — *Biochem. Z.*, 1963, Bd 337, S. 477—480. — 12. Batzri B., Korn E. D. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 298, p. 1015—1019. — 13. Деев А. И., Добрецов Г. Е., Владимиров Ю. А. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 4, с. 548—552. — 14. Kenaston C. B., Wilbur K. M., Ottolenghi A. et al. — *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1955, v. 32, p. 33—35. — 15. Еремина Г. В., Натансон А. О., Петрова Э. А. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1968, № 4, с. 444—450. — 16. Еремина Г. В. — *Лабор. дело*, 1968, № 2, с. 81—84. — 17. Baxter I. G., Robeson C. D. — *Science*, 1940, v. 92, p. 203—204. — 18. Fisher B., Lichti F. U., Lucy I. A. — *Biochem. J.*, 1972, v. 130, p. 259—270. — 19. McFarland B. G. — *Chem. Phys. Lipids*, 1972, v. 8, p. 303—313.

Поступила 25/X 1977 г.

EFFECT OF RETINOL ON PEROXIDATIVE OXIDATION IN PHOSPHOLIPID MEMBRANES

A. I. Deev, G. V. Eremina, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Effect of retinol on kinetics of peroxidation was studied in liposomes, isolated from phospholipids of egg yolk. Peroxidation was initiated by Fe^{2+} and the rate of lipoperoxidation was estimated by TBC-test. Retinol possessed the distinct antioxidative effect at concentrations more than 1 molar per cent in membrane; slight prooxidative effect of the vitamin occurred at lower concentrations. The antioxidative effect of retinol depended on temperature.

УДК 612.12.018:577.175.8:3

А. П. Плетень, В. К. Мазо, С. И. Никуличева, В. А. Шатерник

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА АНГИОТЕНЗИНОГЕНА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ СВИНЕЙ И ОВЕЦ

Научно-исследовательский институт по стандартизации и контролю лекарственных средств
Министерства здравоохранения СССР

Проведена очистка ангиотензиногена из плазмы крови свиней и овец. Содержание ангиотензиногена в препарате, полученном путем фракционирования плазмы крови свиней сульфатом аммония, составило 0,4%. Препарат может быть использован в качестве субстрата в биологическом и иммунологическом методах определения активности ренина. Ангиотензиноген из плазмы крови овец выделяли методом фракционирования сульфатом аммония, хроматографии на ДЭАЭ-Сефадексе и гель-фильтрации на Се-

фадексе G-100. Содержание субстрата в препарате составило 10—13%, что достаточно для получения в дальнейшем радиоактивного препарата ренинового субстрата для радиохимического метода определения активности ренина.

Как известно, в большинстве предложенных методов определения рениновой активности в качестве субстрата используют препараты ангиотензиногена той или иной степени чистоты [1]. Субстрат ренина — ангиотензиноген L₂ глобулиновой фракции белков плазмы крови с мол. весом 58 000 [2].

Требования, предъявляемые к препаратам ангиотензиногена, в значительной мере зависят от выбранного метода определения активности ренина. Так, при использовании биологических и иммунологических методов субстрат должен быть очищен от ангиотензиназ, дальнейшая же его очистка желательна, но не обязательна. Если от ангиотензиназ избавиться полностью не удастся, то к препарату следует добавлять ингибиторы ангиотензиназ. Однако если речь идет о радиохимическом методе определения активности ренина, то требования к чистоте ангиотензиногена резко возрастают [3].

В данной работе была поставлена задача получения ангиотензиногена для дальнейшего применения его в качестве субстрата при определении активности ренина всеми указанными выше методами. Ангиотензиноген выделяли из плазмы крови свиней и овец. Использование крови свиней для получения препаратов ангиотензиногена является наиболее распространенным. В то же время недавно появилась работа [4] о быстром и эффективном методе очистки ангиотензиногена из плазмы крови овец.

Методы

Выделяли и частично очищали ангиотензиноген из плазмы крови свиней, используя методику [5], разработанную для выделения и частичной очистки ренинового субстрата из плазмы крови собак. Очистка ангиотензиногена достигается в этом методе в основном за счет фракционирования белков сульфатом аммония. Полученный препарат полностью удовлетворяет предъявляемым к нему требованиям для определения активности ренина в биологических методах.

Ангиотензиноген из плазмы крови овец выделяли по модифицированной методике [4]. К овечьей плазме (100 мл) добавляли сульфат аммония до концентрации 3,8 М. Осаждение проводили в течение 24 ч. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (25 мин 8000 об/мин) и растворяли в 0,02 М фосфатном буфере pH 7,5 в минимальном объеме. Растворенный осадок диализовали против 0,02 М фосфатного буфера pH 7,5 (5 л) в проточном диализаторе. Колонку (2,5×100 см) заполняли ДЭАЭ-сефадексом А-50 и уравнивали 0,02 М фосфатным буфером pH 7,5. Раствор отдиализованного белка концентрировали ультрафильтрацией на мембранном фильтре до 10 мл и наносили на колонку со скоростью 15 мл/ч. Субстрат элюировали градиентом концентрации хлорида натрия (0—0,5 М). Фракции объемом 10 мл собирали в области концентрации 0,1—0,15 М хлорида натрия — с № 25 по № 40 (рис. 1). Собранные фракции (300 мл) концентрировали ультрафильтрацией в 10 раз и полученный раствор диализовали на проточном диализаторе против 0,02 М фосфатного буфера pH 7,5 (5 л). После диализа раствор ангиотензиногена наносили на колонку G-100 (2,5×100 см). Фракции, содержащие ангиотензиноген, собирали в объеме 100 мл (рис. 2). Полученный раствор концентрировали ультрафильтрацией в 10 раз и замораживали при —26°C. Выделение ангиотензиногена на всех стадиях проводили при 4°C.

Содержание ангиотензиногена определяли непрямым биологическим методом [6] на крысах по повышению артериального давления, вызываемому ангиотензином, образу-

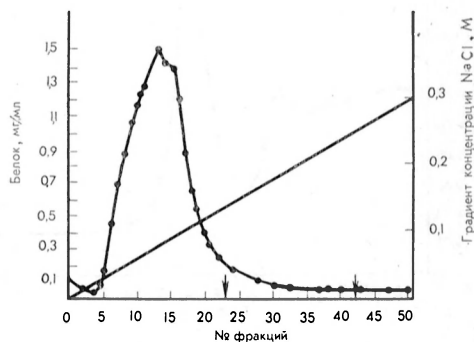


Рис. 1. Хроматография ангиотензиногена из плазмы крови овец после фракционирования сульфатом аммония на ДЭАЭ-Сефадексе А-50.

130 мл раствора ангиотензиногена после фракционирования сульфатом аммония (концентрация белка 20 мг/мл); колонка размером 2,5×100 см, уравниваемая 0,02 М фосфатным буфером pH 7,5. Градиентная элюция раствором хлорида натрия в 0,02 М фосфатном буфере pH 7,5; скорость элюции 15 мл/ч. Стрелками отмечен интервал белковых фракций, использованных для дальнейшей очистки.

щимся из ангиотензиногена при инкубации с ренином. Использовали препарат свиного ренина, выделенного по методу [7] на стадии фракционирования сульфатом аммония. Препарат представляет собой лиофильно высушенный порошок. 10 г препарата ренина растворяли в 0,3 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 7,4 и затем добавляли 1,7 мл физиологического

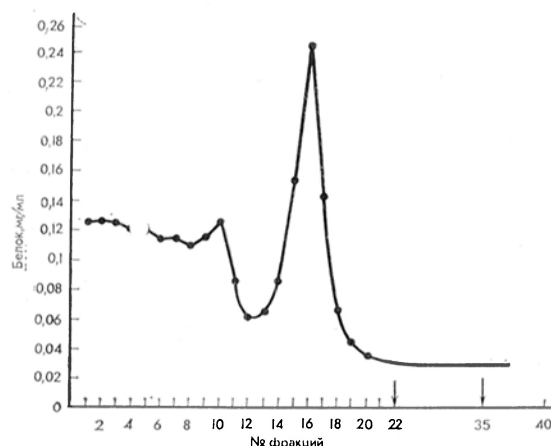


Рис. 2. Гель-фильтрация ангиотензиногена из плазмы крови овец на сефадексе G-100.

20 мл раствора ангиотензиногена после хроматографии на ДЭАЭ-Сефадексе А-50 (концентрация белка 0,7 мг/мл); колонка размером 2,5×100 см, уравновешенная 0,02М фосфатным буфером pH 7,5. Элюция 0,02 М фосфатным буфером pH 7,5; скорость элюции 20 мл/ч. Стрелками отмечен интервал белковых фракций конечного раствора ангиотензиногена.

раствора. К раствору фермента добавляли 1 мл исследуемой пробы ангиотензиногена. Таким образом, концентрация фермента способствовала полному расщеплению ангиотензиногена ренином. Смесь инкубировали 1 ч при 37°C. После инкубации pH смеси доводили до 5,5 0,2 н. HCl и пробу нагревали на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Образовавшийся при кипячении осадок удаляли центрифугированием (20 мин при 6000 об/мин). К надосадочной жидкости добавляли 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4 для нейтрализации pH растворов проб. 0,2 мл полученной смеси вводили в бедренную вену крысам-самцам линии Вистар массой 190—200 г и регистрировали изменение давления у животных под влиянием ангиотензина. В качестве стандарта при определении содержания ангиотензина использовали образец ангиотензинамида производства Рижского института органического синтеза в концентрации 80 нг/мл.

Ангиотензиновую активность получаемых препаратов ангиотензиногена определяли по методу [8] с помощью стандартного образца анги-

иотензинамида производства Рижского института органического синтеза. Стандартный образец добавляли к испытуемому раствору ангиотензиногена в концентрации 1000 нг/мл. Аликвоты исследуемых проб отбирали после 1 ч инкубации при 37°C и содержание ангиотензин-амида определяли по изменению артериального давления у крыс-самцов линии Вистар массой 190—200 г в остром опыте.

Результаты и обсуждение

Содержание ренинового субстрата в плазме крови свиней составляет приблизительно $8 \times 10^{-4} \%$ [1], а содержание ангиотензиногена в препарате, полученном фракционированием, сульфатом аммония, составило 0,4 %, что указывает на очистку препарата в 500 раз. Была предпринята попытка дальнейшей очистки полученного препарата свиного ангиотензиногена путем введения стадии очистки хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе согласно методу [9], которая, однако, не привела к желаемому результату вследствие низкого выхода белкового материала. При определении ангиотензиновой активности было обнаружено, что препарат содержит некоторое количество ангиотенгиназ, поэтому для определения активности ренина в инкубационную смесь следует добавлять ингибиторы ангиотенгиназ. Полученный препарат свиного ангиотензиногена может быть использован при определении активности ренина биологическим и иммунологическим методами.

Препарат с относительно высоким содержанием ангиотензиногена был получен из плазмы крови овец [4] (см. таблицу). Как видно из таблицы, в данной работе была проведена трехстадийная очистка ангиотензиногена, которая привела к увеличению концентрации ангиотензиногена в 15 000 раз. В работе [4] в качестве исходного материала использовали плазму крови нефректомированных овец, которую подвергали дальнейшей очистке хроматографией на ДЭАЭ-Сефадексе и гель-фильтрацией на Сефадексе G-100. В результате нефректомирования овец содержание ангиотензиногена в плазме крови повышалось в 6 раз. Такое повышение активности исходного

материала облегчало получение высокоочищенного препарата. В нашей работе использовали плазму крови обычных животных, поэтому для повышения содержания ангиотензиногена в препарате нами была введена стадия предварительной очистки — фракционирование сульфатом аммония. На этой стадии содержание ангиотензиногена в препарате возрастало приблизительно в 280 раз. Активность препарата после хроматографической очистки на ДЭАЭ-Сефадексе была выше активности препарата на этой же стадии, полученного в работе [4]. Более высокая активность полученного продукта в нашей работе была обусловлена тем обстоятельством, что на колонку с ДЭАЭ-Сефадексом наносили уже очищенный белковый материал.

В препарате, полученном в данной работе, содержание ангиотензиногена составляет 10—13 %. Такое содержание активного препарата, на наш взгляд, является достаточным для получения в дальнейшем радиоактивного препарата ренинового субстрата для радиохимического метода определения активности ренина [10].

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института биохимической химии им. М. М. Шемякина АН СССР Л. М. Гинодману и Л. Д. Румшу за обсуждение результатов данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Helmer O. M. — In: *Kidney Hormones*. Ed. J. W. Fischer. New York, 1971, p. 59—85. — 2. Лиелайс Я. П., Чипенс Г. И. — В кн.: *Химия и биология пептидов*. Рига, 1971, с. 113. — 3. Goodfriend T. L., Ball D. S., Farley D. B. — *J. Lab. clin. Med.*, 1968, v. 72, p. 648. — 4. Skinner S. L., Dunn J. R., Mazzetti J. et al. — *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1975, v. 53, p. 77. — 5. Sen S., Smyth R. R., Bumpus F. M. — *Biochemistry (Wash.)*, 1967, v. 6, p. 1572—1581. — 6. Серебровская Ю. А., Учитель И. А. — *Лабор. дело*, 1970, № 7, с. 421. — 7. Rubin J. — *J. clin. Lab. Invest.*, 1972, v. 29, p. 51—58. — 8. Lubash J. D., Peart W. S. — *Biochim. biophys. Acta*, 1966, v. 122, p. 289. — 9. Skeggs L. T., Leutz K. E., Hochstrasser H. et al. — *J. exp. Med.*, 1963, v. 118, p. 73—97. — 10. Lentz K. E., Skeggs L. T., Dorer F. E. et al. — *Analyt. Biochem.*, 1976, v. 74, p. 1.

Поступила 2/XI 1977 г.

ISOLATION AND PURIFICATION OF ANGIOTENSINOGEN FROM PIG AND SHEEP BLOOD PLASMA

A. P. Pleten, V. K. Mazo, S. I. Nikulicheva, V. A. Shaternikov

Research Institute for Standardization and Control of Drugs, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Angiotensinogen (a substrate of renin) was isolated from pig and sheep blood plasma. Content of angiotensinogen was estimated in the preparations obtained by an indirect biological method, which was based on estimation of an increase in blood pressure in rats, caused by angiotensin, liberated from angiotensinogen during incubation with renin. The preparation, obtained by ammonium sulphate fractionation of pig blood plasma, contained 0.4% of angiotensinogen. Angiotensinogen was also isolated from sheep blood plasma using ammonium sulphate fractionation, DEAE-Sephadex chromatography and gel filtration through Sephadex G-100; this preparation contained 10-13% of angiotensinogen.

Б. А. Атаханова, Я. Х. Туракулов, М. Ташмухамедова, М. В. Шеталова

БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЕ ИЗ КЛЕТОК РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Лаборатория биохимии гормонов Института биохимии АН Узбекской ССР, Ташкент

Основным белком, синтезируемым в бесклеточной (S_{30}) белоксинтезирующей системе из клеток рака щитовидной железы (папиллярно-фолликулярная аденокарцинома), является тиреоальбумин; помимо тиреоальбумина, в этой системе происходит синтез 3—8S субъединиц тиреоглобулина, однако образования полной молекулы 19S тиреоглобулина в системе не происходит. Можно полагать, что при раке щитовидной железы имеет место блокада биосинтеза тиреоглобулина на уровне полимеризации полипептидных цепей.

Ранее мы исследовали биосинтез белков в бесклеточной белоксинтезирующей системе из клеток узлового эутиреоидного зоба [1]. Установлено, что клетки узлового эутиреоидного зоба усиленно синтезируют тиреоальбумин.

В экстрактах рака щитовидной железы содержание тиреоальбумина, как правило, превышает количество тиреоглобулина [2—8]. Описаны слу-

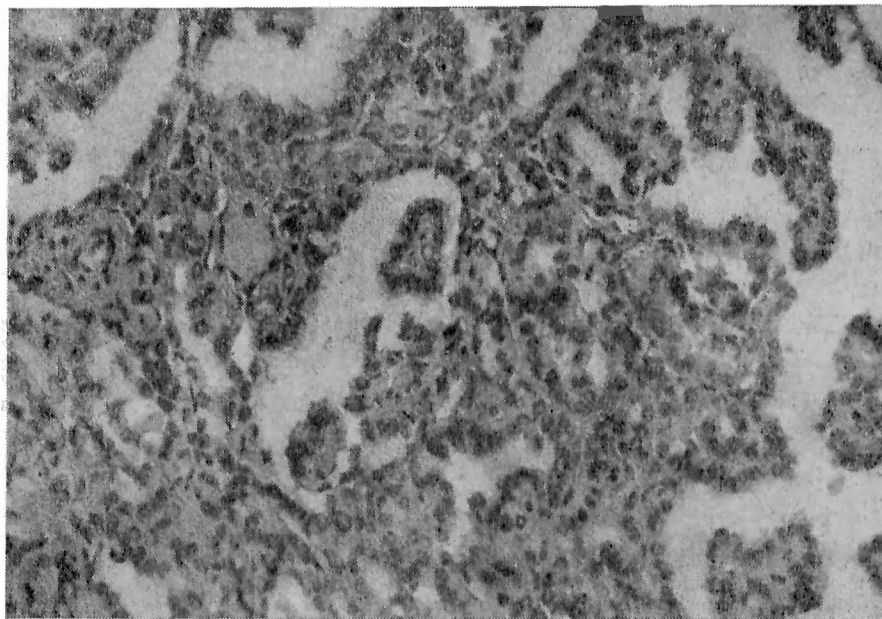


Рис. 1. Папиллярно-фолликулярная аденокарцинома из А-клеток.

Видны многочисленные неправильной формы сосочки, выстланные кубическим и цилиндрическим с пузырькообразными ядрами эпителием, расположенным в 2—3 ряда. Изредка встречаются небольшие фолликулы, заполненные бледно-розовым коллоидом. Строма опухоли представлена разросшейся соединительной тканью. Окраска гематоксилин-эозином, ув. 8×12,5.

чай, когда в ткани тиреоидной карциномы тиреоглобулин отсутствовал совсем [9], а весь экстракт щитовидной железы состоял в основном из тиреоальбумина [8]. Представляло несомненный интерес исследовать биосинтез белка в бесклеточной системе из клеток рака щитовидной железы.

Методика исследования

Больная К., 51 года. Клинический диагноз: смешанный зоб IV степени со сдавлением трахеи. Патогистологический диагноз: папиллярно-фолликулярная аденокарцинома.

ма из А-клеток (рис. 1). Операционный материал получен в зобном отделении Института краевой медицины Министерства здравоохранения Узбекской ССР.

Компоненты белоксинтезирующего аппарата (рибосомы, белковые факторы трансляции, тРНК и аминоацил-тРНК-синтетазы) вносили в систему в виде фракции, получаемой центрифугированием гомогената клеток при 30 000 g в течение 10 мин (фракция S_{30}) [10]. Для удаления аминокислот фракцию S_{30} непосредственно перед добавлением в систему пропускали через колонку с сефадексом G-25 (грубый). Концентрация фракции S_{30} в системе составляла 20 ед. А₂₆₀ на 1 мл. Стандартная реакционная смесь содержала (в мкмоль/мл): АТФ — 0,5, ГТФ — 0,05, фосфоэнолпируват — 10, β-меркаптоэтанол — 5,0, MgCl₂ — 15,0, KCl — 70,0, трис-HCl pH 7,8 — 50, пируваткиназу — 16 мкг. Смесь аминокислот (0,03 мкмоль/мл) состояла из 4 равномерно меченых ¹⁴C-аминокислот (Чехословакия) — фенилаланина, серина, аланина, лизина — и 16 немеченых аминокислот.

Бесклеточную систему инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Об эффективности белкового синтеза в системе судили по пробирочному включению. Контролем служили пробы с нулевым временем инкубации. Обработку проб после инкубации проводили по методу, описанному ранее [11].

При анализе белков, синтезируемых в бесклеточной белок-синтезирующей системе из клеток рака щитовидной железы, реакцию останавливали быстрым охлаждением и добавлением равного объема 0,05 М трис-HCl-буфера pH 7,2. Рибосомы осаждали центрифугированием при 165 000g в течение 2 ч (центрифуга ВАК-601). Надосадочную жидкость диализовали в течение ночи против 0,05 М трис-HCl буфера pH 7,2 и концентрировали фиколом до 0,5 мл.

Анализ синтезируемых белков осуществляли с помощью диск-электрофореза [12] в 5% полиакриламидном геле при pH 8,3. Гели окрашивали 0,2% раствором кумасси ярко-голубого. Окрашенные гели денситометрировали на микрофотометре G-2. Неокрашенные гели разрезали на отдельные диски по 3 мм и измеряли радиоактивность фракций в жидком сцинтилляторе на счетчике «Mark-3». Иммунохимическую идентификацию синтезированных белков проводили постановкой реакции двойной иммунодиффузии в геле [13].

Результаты и обсуждение

Включение ¹⁴C-аминокислот в бесклеточной белоксинтезирующей системе из клеток рака щитовидной железы составляло в опыте (инкубация в течение 60 мин) 2350 ± 74 имп/мин на 20 ед. S_{30} , в контроле (без инкубации) — 204 ± 35 имп/мин. Эти результаты показывают, что в бесклеточной белоксинтезирующей системе из клеток рака щитовидной железы имеет место синтез белков, что свидетельствует об эффективности системы.

На рис. 2 приведены электрофореграмма и денситограмма, полученные после фракционирования при помощи электрофореза в полиакриламидном геле растворимых белков, синтезированных в бесклеточной системе из клеток рака щитовидной железы. На электрофореграмме основная белковая полоса имеет электрофоретическую подвижность альбумина сыворотки человека, т. е. представлена тиреоальбумином. При постановке реакции иммунодиффузии с антитиреоглобулиновой сывороткой дуги преципитации с этой белковой фракцией не образовывались; это указывает на то, что данный белок не имеет иммунологического родства с тиреоглобулином. Ранее было установлено иммунологическое родство тиреоальбумина с альбумином сыворотки крови [8].

Две четко выраженные полосы отмечаются в области 3—8 S субъединиц тиреоглобулина. Эти белки образовали дуги преципитации с антисывороткой кроликов к тиреоглобулину (рис. 3), что подтверждает их иммунологи-

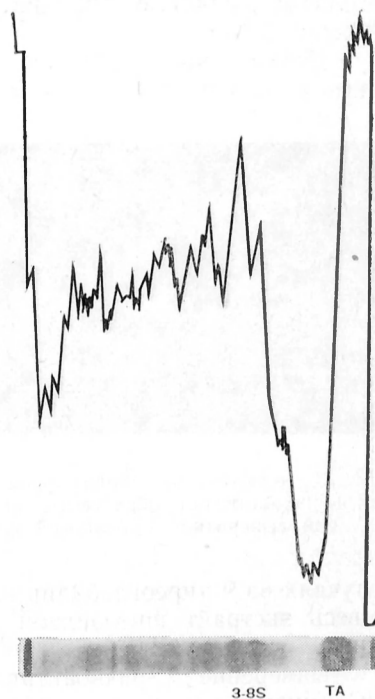


Рис. 2. Денситограмма и электрофореграмма растворимых белков бесклеточной системы синтеза белка из клеток рака щитовидной железы.

ческое родство с тиреоглобулином. Полоса, соответствующая 19S тиреоглобулину, на электрофореграмме не видна. Таким образом, при фракционировании растворимых белков, синтезированных в бесклеточной системе из клеток рака щитовидной железы на полиакриламидном геле, выявлены три основные белковые фракции: тиреоальбумин и две 3—8S субъединицы тиреоглобулина.

Другие авторы [9] при исследовании профилей седиментации растворимых белков солевых экстрактов щитовидных желез в 3 случаях рака

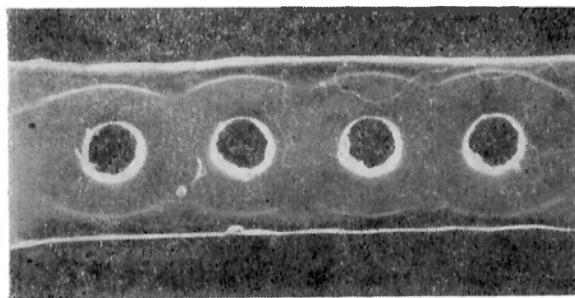


Рис. 3. Двойная иммунодиффузия в геле. Видны дуги преципитации, образуемые антитиреоглобулиновой сывороткой с белковой фракцией 3—8S.

щитовидной железы (в 1 — анапластический рак и в 2 — папиллярный рак) не обнаружили стабильного тиреоглобулина, растворимые белки этих опухолей были представлены только легкими фракциями. Легкие фракции разделялись по крайней мере на 3 белковые полосы, основная полоса имела такую же электрофоретическую подвижность, как и человеческий сывороточный альбумин.

Отмечено [8], что в 2 случаях из 9 тиреоглобулин в ткани тиреоидной карциномы отсутствовал, а весь экстракт щитовидной железы состоял в основном из тиреоальбумина.

Измерение ^{14}C -радиоактивности фракций гелей показало, что включение ^{14}C -аминокислот в растворимые белки, синтезируемые в бесклеточной системе из клеток рака щитовидной железы, в 3—4 раза ниже, чем в случае узлового эутиреоидного зоба и в норме (общее включение в гель в случае рака составляло 1929 имп/мин, в случае зоба — 7443 имп/мин в норме — 10 049 имп/мин). Это свидетельствует о невысоком уровне синтеза белка в раковых клетках. Основные пики радиоактивности были выявлены во фракциях 22 и 26—27 (рис. 4).

Окрашиванием параллельного геля определено, что пик радиоактивности во фракции 22 совпадает с 3—8S субъединицами тиреоглобулина, а во фракциях 26—27 — с тиреоальбумином. Во фракции 7, соответствующей тиреоглобулину, пик радиоактивности не определялся.

Подсчет ^{14}C -радиоактивности показал, что она распределяется следующим образом: тиреоальбумин—24,7 %, 3—8S субъединицы тиреоглобулина — 15,4 % от всей определяемой в геле радиоактивности.

Таким образом, основной белок, синтезируемый в бесклеточной белок-синтезирующей системе из клеток рака щитовидной железы, — тиреоальбумин. Помимо тиреоальбумина в этой системе происходит синтез 3—8S субъединиц тиреоглобулина, 19S, меченый тиреоглобулин в системе не определялся.

Ранее мы показали [14], что появление в бесклеточной системе из клеток щитовидной железы меченого тиреоглобулина происходит вследствие обмена вновь синтезированных субъединиц тиреоглобулина с субъединицами предобразованного тиреоглобулина. Отсутствие меченого 19S тиреоглобулина в бесклеточной белоксинтезирующей системе из клеток рака щитовидной железы связано с тем, что в данном случае, по-видимому, имеет место блокада биосинтеза тиреоглобулина на уровне полимеризации полипептидных цепей, как это наблюдалось и в случае врожденного зоба [15]. Это приводит к тому, что в бесклеточной белоксинтезирующей системе из клеток рака щитовидной железы стабильный тиреоглобулин отсутствует.

По данным авторов [9], исследовавших включение ^{14}C -аминокислот в растворимые белки в раковых тканях, в 3 случаях (в 2 — анапластический рак, изученный в культуре, и в 1 — папиллярная карцинома) из 12 исследованных папиллярных опухолей включения ^{14}C -аминокислот в тиреоглобулин не наблюдалось, метка включалась только в легкие фракции, что было показано ультрацентрифугированием и электрофорезом в полиакриламидном геле.

Присутствие альбумина среди тиреоидных белков показано и другими исследователями [16—18], но источник этого альбумина не определен. Исследования *in vitro* [19] дают основание предполагать, что по крайней мере часть йодированного альбумина, экстрагируемого из нормальной щитовидной железы, синтезируется самой тиреоидной тканью. В противоположность этому при исследовании врожденного зоба [15], а также нормальной тиреоидной ткани [20] не установлено включения ^{14}C -аминокислот во фракции альбумина в органной культуре. По мнению авторов, йодальбумин не синтезируется щитовидной железой, а образуется из сывороточного альбумина и йодируется при прохождении через щитовидную железу. Эту гипотезу подтверждают и результаты, полученные при некоторых экспериментальных зобах [21].

Установлено [8] включение меченых аминокислот *in vivo* и *in vitro* в состав тиреоальбумина. Это свидетельствует о том, что синтез тиреоальбумина происходит в самой щитовидной железе. Результаты определения аминокислотного состава тиреоальбумина и альбумина сыворотки, а также спектрального анализа, полученные автором, являются аргументами для заключения о неидентичности тиреоальбумина и альбумина сыворотки крови.

Итак, мы установили, что в случае рака щитовидной железы биосинтез белков претерпевает еще более резкие нарушения, чем это наблюдалось при узловом эутиреоидном зобе [1]: бесклеточная система из клеток рака щитовидной железы характеризуется низким включением меченых аминокислот, основным синтезируемым белком является тиреоальбумин; помимо этого, происходит синтез 3—8S субъединиц тиреоглобулина, однако из-за отсутствия стабильного тиреоглобулина меченый 19 S тиреоглобулин в системе не определяется. Можно полагать, что в данном случае рака щитовидной железы имеет место блокада биосинтеза тиреоглобулина на уровне полимеризации полипептидных цепей.

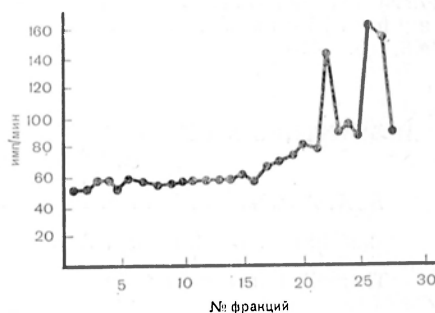


Рис. 4. Радиоактивность электрофоретических фракций растворимых белков бесклеточной системы синтеза белка из клеток рака щитовидной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Саатов Т. С. и др. — Вopr. мед. химии, 1977, № 5, с. 68—72. — 2. Robbins J., Wolf J., Rall J. E. — *Endocrinology*, 1959, v. 64, p. 37. — 3. Hales I., Lane J., Richards M. et al. — *Acta endocr. (Kbh.)*, 1965, v. 48, p. 513. — 4. Valenta L. et al. — *J. clin. Endocr.*, 1966, v. 26, p. 1317. — 5. Vapotti A., Lemarchand-Beraud T., Valenta L. — In: *Thyroid Cancer*. Ed. C. E. Hedinger. Berlin, 1969, p. 31. — 6. Lupescu A., Andreani D., Monaco F. et al. — *J. clin. Endocr.*, 1968, v. 28, p. 1257—1269. — 7. Constantinescu A., Negoescu I., Dou M. et al. — *Rev. roum. Endocr.*, 1971, v. 8, p. 327. — 8. Саатов Т. С. Тиреоглобулин и другие йодированные белки щитовидной железы. Дис. докт. Ташкент, 1974. — 9. Thomas-Morgan C., Nataf B. M., Tubiana M. — *Acta endocr. (Kbh.)*, 1974, v. 76, p. 651—669. — 10. Aviv H., Boime J., Leder P. — *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, p. 2303—2307. — 11. Туракулов Я. X., Атаханова Б. А., Кадырова Д. А. —

Пробл. эндокринол., 1975, № 2, с. 82—85. — 12. Davis B. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, p. 404. — 13. Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Туракулов Я. Х. — Узб. биол. ж., 1976, № 1, с. 6—8. — 14. Атаханова Б. А., Туракулов Я. Х., Кадырова Д. А. — Биохимия, 1975, № 6, с. 1168—1174. — 15. Thomas-Morvan C., Nataf B. M., Tubiana M. — Acta Endocr. (Kbh.), 1973, v. 73, p. 22—34. — 16. Shulman S., Rose N. R., Whitebsky E. — Fed. Proc., 1957, v. 16, p. 433. — 17. Jonckheer M. H. — Ann. Endocr. (Paris), 1963, v. 24, p. 756. — 18. Torresani J., Roques M., Peyrot A. et al. — Acta Endocr. (Kbh.), 1968, v. 57, p. 153. — 19. Otten J., Jonckheer M., Dumont J. E. — J. clin. Endocr., 1971, v. 32, p. 18. — 20. Ceriani R., Thomas-Morvan C., Nataf B. — C. R. Acad. Sci. (Paris) Ser. D., 1971, v. 272, p. 2089. — 21. Van Middleworth L., Triantaphyllidis E., In Young S. et al. — In: Thyroid Neoplasia. London, 1968, p. 415.

Поступила 15/XI 1977 г.

BIOSYNTHESIS OF PROTEINS IN CELL-FREE SYNTHESIZING SYSTEM FROM CELLS OF STRUMA MALIGNA

B. A. Atakhanova, Ya. Kh. Turakulov, M. Tashmukhamedova, M. V. Shetalova,

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Thyroalbumin was the main protein, synthesized in cell-free (S_{30}) system, obtained from cells of struma maligna (papillary-follicular adenocarcinoma); besides, synthesis of 3-8 S subunits of thyroglobulin occurred but 19 S thyroglobulin molecule did not form in the system. Block of thyroglobulin biosynthesis appears to occur at the level of polymerization of polypeptide chains in this case of struma maligna.

УДК 616.13-004.6-036.4-092.9-07:616.36-008.939.15-074

П. П. Чаяло

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ НА РАННИХ СТАДИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА В СВЯЗИ С ВОЗРАСТОМ

Лаборатория патофизиологии Института геронтологии АМН СССР, Киев

Исследовали содержание холестерина, триглицеридов и фосфолипидов в крови и ткани печени, а также скорость их биосинтеза в печени у молодых (8—12-месячных) и старых (42—48-месячных) кроликов в норме, а также при экспериментальном холестериновом атеросклерозе (на 10—15-й и 25—30-й дни).

Отмечено снижение скорости биосинтеза всех указанных классов липидов в печени по мере старения. При содержании животных на атерогенном рационе нарушения в обмене липидов были более выражены у 42—48-месячных кроликов, особенно при нахождении на атерогенном рационе в течение 25—30 дней. Большее накопление холестерина в печени у старых кроликов сочеталось с большим подавлением его биосинтеза и более выраженной гиперхолестеринемией.

Характер взаимоотношения возрастных и атеросклеротических изменений в организме служит объектом тщательного изучения геронтологов, как клиницистов, так и экспериментаторов. Внимание к этому вопросу объясняется известным фактом прогрессирования атеросклеротических поражений сосудистых стенок по мере старения, что является патогенетической основой сердечно-сосудистых заболеваний, стоящих на первом месте среди причин, лимитирующих продолжительность человеческой жизни в настоящее время [1]. Тем не менее постановка исследований по указанной проблеме в клинике связана с трудностями, обусловленными часто невозможностью разграничить возрастные, физиологические и патологические изменения в сердечно-сосудистой и других системах. В то же время условия эксперимента позволяют изучать онтогенетические особенности развития атеросклероза, используя для этих целей животных,

у которых в норме не наблюдаются поражения сосудов атеросклеротической природы.

В литературе представлены убедительные данные, свидетельствующие о том, что возраст накладывает определенный отпечаток на степень нарушений липидного обмена при моделировании атеросклероза в эксперименте на животных. Показано, что содержание кроликов разного возраста на холестеринном рационе сопровождается развитием у них гиперлипидемии и атеросклеротических поражений в аорте, более выраженных у старых животных [2]. Сходные данные о влиянии возраста на интенсивность развития экспериментального атеросклероза получены в опытах на животных других видов [3, 4]. Однако причины отмеченных возрастных различий, в частности со стороны липидных показателей крови, не совсем ясны.

При обсуждении этого вопроса необходимо учитывать роль печени как органа, который во многом обеспечивает постоянство уровня основных классов липидов в крови и занимает центральное место в их метаболизме [5]. Имеются данные, свидетельствующие о значительном нарушении функции печени при атеросклерозе, что затрагивает ряд ферментных систем и, естественно, не может не сказаться на ее участии в регуляции липидного обмена [6]. Показаны изменения в биосинтезе липидов в процессе воспроизведения экспериментального атеросклероза [7, 8]. Тем не менее эти работы выполнены без учета возрастного фактора. Имеющиеся данные литературы о характере биосинтеза липидов в печени в связи с возрастом немногочисленны и, как правило, основаны на исследованиях у интактных животных в норме [9—11].

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей обмена некоторых классов липидов (их содержания и биосинтеза) в печени кроликов разного возраста в динамике воспроизведения экспериментального холестеринного атеросклероза.

М е т о д и к а

Опыты проведены на 62 молодых (8—12-месячных) и старых (42—48-месячных) кроликах-самках. Экспериментальный атеросклероз вызывали введением *per os* 10% раствора холестерина в подсолнечном масле ежедневно на протяжении 25—30 дней из расчета 0,1 г холестерина на 1 кг массы тела кролика в сутки. Часть животных были забиты через 10—15 дней от начала эксперимента.

В сыворотке крови и печени животных определяли общий холестерин [12], фосфолипиды [13] и триглицериды [14]. Биосинтез холестерина, фосфолипидов и триглицеридов в печени исследовали *in vitro*. Животных декапитировали через 12—16 ч после последнего приема пищи в одно и то же время суток, ткани извлекали на холоде, отбирали навеску 200—300 мг и после приготовления срезов толщиной 0,5—1 мм помещали их в инкубационную камеру, содержащую 2 мл 0,1 М кребс-рингера-фосфатного буфера pH 7,4, 200 мг глюкозы на 100 мл смеси и 5 мкмоль уксуснокислого натрия. Инкубацию проводили в течение 2 ч в атмосфере 95% O₂ и 5% CO₂ в камере Варбурга при 37°C. В инкубационную смесь добавляли 5 мКи ¹⁴C-ацетата натрия [15]. После инкубации проводили экстракцию липидов [16] с последующим разделением их на классы при помощи тонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля с гипсом в системе гексан — эфир — уксусная кислота [17]. Нужные для исследования классы липидов извлекали с хроматограммы смесью хлороформ — метанол (2:1) и использовали для количественного определения и измерения радиоактивности в газопроточном счетчике «Протока». Удельную активность липидов выражали в импульсах/мин/мг соответствующих классов липидов. При подсчете учитывали поправки на фон и самопоглощаемость [18]. Полученные цифровые данные обработаны статистически [19].

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

В табл. 1 представлены результаты определения общего холестерина, фосфолипидов и триглицеридов в сыворотке крови и печени 8—12- и 42—48-месячных кроликов в норме и после введения холестерина на протяжении 10—15 и 25—30 дней.

Из таблицы следует, что у животных в норме не отмечено возрастных различий изученных показателей липидного обмена. Кормление холесте-

рином уже через 10—15 дней статистически вызывает достоверное повышение содержания общего холестерина, фосфолипидов и триглицеридов в крови подопытных кроликов. Продление эксперимента до 25—30 дней сопровождается дальнейшим нарастанием общего холестерина и фосфолипидов. Увеличение количества триглицеридов в эти сроки у животных обеих возрастных групп не было статистически достоверным.

Возрастные различия наблюдались только у кроликов, находящихся в опыте в течение 1 мес, и выражались в большем увеличении количества общего холестерина и фосфолипидов у 42—48-месячных животных при со-

Т а б л и ц а 1

Показатели липидного обмена в крови и печени молодых и старых кроликов в норме и при введении холестерина

| Объект исследования | Возраст кроликов, мес | Исследуемый показатель | Контроль (норма) | Длительность введения холестерина, дни | |
|---------------------|-----------------------|--|------------------|--|--------------------------------|
| | | | | 10—15 | 25—30 |
| Сыворотка крови | 8—12 | Общий холестерин, г/л | 0,720±0,028 | 1,93±0,111 ^{а, б} | 2,56±0,181 ^{а, в} |
| | 42—48 | стерин, г/л | 0,712±0,036 | 2,04±0,114 ^{а, б} | 4,80±0,394 ^а |
| | 8—12 | Фосфолипиды, г/л | 0,738±0,031 | 1,40±0,082 ^{а, б} | 1,90±0,149 ^{а, в} |
| | 42—48 | г/л | 0,774±0,033 | 1,42±0,083 ^{а, б} | 2,46±0,132 ^а |
| | 8—12 | Триглицериды, г/л | 0,314±0,019 | 0,609±0,043 ^а | 0,689±0,054 ^а |
| | 42—48 | г/л | 0,379±0,029 | 0,618±0,039 ^а | 0,671±0,066 ^а |
| | 8—12 | Коэффициент общий холестерин/фосфолипиды | 0,97±0,04 | 1,36±0,03 ^а | 1,35±0,02 ^а |
| Печень | 42—48 | фосфолипиды | 0,92±0,05 | 1,44±0,02 ^{а, б} | 1,95±0,11 ^{а, в} |
| | 8—12 | Общий холестерин, г на 100 г ткани | 0,333±0,013 | 0,385±0,024 | 0,453±0,025 ^а |
| | 42—48 | г на 100 г ткани | 0,369±0,020 | 0,407±0,053 | 0,546±0,034 ^{а, б, в} |
| | 8—12 | Фосфолипиды, г на 100 г ткани | 3,01±0,171 | 3,49±0,194 | 3,62±0,145 ^а |
| | 42—48 | г на 100 г ткани | 2,94±0,323 | 3,44±0,196 | 4,03±0,327 ^а |
| | 8—12 | Триглицериды, г на 100 г ткани | 0,486±0,035 | 0,502±0,030 | 0,520±0,020 |
| | 42—48 | г на 100 г ткани | 0,503±0,022 | 0,535±0,027 | 0,534±0,013 |

П р и м е ч а н и е. Статистически достоверные различия: ^а — между контролем и опытом, ^б — между разными сроками нахождения животных в опыте, ^в — между разными возрастными группами. Статистически достоверными считали различия между средними арифметическими групп при вероятности $P < 0,05$. В группах насчитывалось не менее 8 животных.

поставлении с молодыми кроликами. Это отражалось и на величине коэффициента общий холестерин/фосфолипиды, который был выше у старых кроликов. При этом у них наблюдалось некоторое отставание подъема фосфолипидов вслед за увеличением содержания общего холестерина при сопоставлении с 8—12-месячными животными через 25—30 дней от начала эксперимента. Так, если у последних прирост общего холестерина и фосфолипидов был примерно равным и составлял 300—350%, то у старых кроликов при повышении уровня общего холестерина в 7 раз содержание фосфолипидов увеличивалось лишь в 3 раза. Если исходить из точки зрения о том, что фосфолипиды способствуют стабилизации гидрофобной молекулы холестерина в растворе [20], то приведенные факты, свидетельствующие, с одной стороны, о более высоком уровне общего холестерина, а с другой — о меньшем увеличении количества фосфолипидов у 42—48-месячных кроликов, чем у молодых животных, следует расценивать как факторы, спо-

способствующие большей выраженности атеросклеротических нарушений при моделировании их у старых животных.

У животных, находившихся на атерогенном рационе, отмечено также нарастание количества липидов в печени. Однако статистически достоверным оказалось лишь увеличение содержания общего холестерина и фосфолипидов через 25—30 дней от начала эксперимента. Возрастные различия, отмеченные в этот период, касались только общего холестерина и характеризовались большим накоплением этого стероида в печени 42—48-месячных кроликов.

При анализе результатов изучения биосинтеза различных классов липидов в печени следует отметить следующие особенности, иллюстрируемые данными табл. 2. В норме наблюдается снижение удельной активности всех изученных классов липидов при старении. У подопытных животных через

Т а б л и ц а 2

Удельная активность некоторых классов липидов печени молодых и старых кроликов в норме и при введении холестерина (в имп/мин/мг)

| Возраст кроликов, мес | Исследуемый показатель | Контроль (норма) | Длительность введения холестерина, дни | |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|--|----------------------------|
| | | | 10—15 | 25—30 |
| 8—12 | Общий холестерин | 8260±610 ^б | 6150±695 ^{а, б} | 3880±732 ^{а, б} |
| 42—48 | | 5890±666 | 4200±704 ^б | 1790±345 ^а |
| 8—12 | Фосфолипиды | 8060±593 ^б | 9350±991 | 11900±1250 ^а |
| 42—48 | | 5540±603 | 7180±713 | 8920±1230 ^а |
| 8—12 | Триглицериды | 17400±1120 ^б | 21900±2247 | 23200±1640 ^{а, б} |
| 42—48 | | 11600±720 | 14900±2411 | 16100±1970 ^а |

П р и м е ч а н и е. Статистически достоверные различия: ^а — между контролем и опытом; ^б — между разными сроками нахождения животных в опыте; ^в — между разными возрастными группами. Статистически достоверными считали различия между средними арифметическими групп при вероятности $P < 0,05$. В группах насчитывалось не менее 7 животных.

10—15 дней от начала опыта регистрируется угнетение биосинтеза холестерина (статистически достоверное только у молодых кроликов). Удлинение экспериментального периода до 25—30 дней обуславливает дальнейшее снижение включения радиоактивной метки в холестерин печени животных обеих возрастных групп. При этом статистически достоверные различия отмечены как по отношению к контрольным цифрам (нормальные животные), так и к цифрам, характеризующим биосинтез холестерина у кроликов, находящихся в опыте 10—15 дней. Для животных, получавших атерогенную диету на протяжении 25—30 дней, также обнаружены возрастные различия, обусловленные более резким угнетением биосинтеза холестерина в эти сроки у старых кроликов по сравнению с 8—12-месячными животными. Говоря об изменениях удельной активности других классов липидов у подопытных кроликов, необходимо отметить повышение биосинтеза фосфолипидов и триглицеридов, особенно через 25—30 дней после начала эксперимента. В эти же сроки сохраняются возрастные различия между скоростью биосинтеза триглицеридов, наблюдаемые и у контрольных животных.

В то же время возрастные различия скорости биосинтеза фосфолипидов у контрольных кроликов до опыта, после введения животным холестерина на протяжении 1 мес не сохраняются. Последний факт свидетельствует о довольно высокой активности биосинтеза фосфолипидов у старых кроликов.

Сопоставляя результаты количественного определения отдельных показателей липидного обмена в крови и печени и скорости их биосинтеза в последней у экспериментальных животных, необходимо отметить наличие

определенных связей между ними, особенно отчетливо проявляющихся в случае общего холестерина. Так, увеличение содержания в крови холестерина при его введении животным сопровождается накоплением данного соединения в ткани печени и снижением в ней биосинтеза холестерина. При этом большее накопление холестерина в печени старых кроликов сочетается с большим подавлением его биосинтеза и более выраженной гиперхолестеринемией. Эти данные согласуются с представлением о том, что экзогенный холестерин, поступая в печень, оказывает регулирующее влияние на его биосинтез по принципу обратной связи [21]. В меньшей степени такие соотношения прослежены в отношении механизмов, регулирующих биосинтез фосфолипидов и триглицеридов. Показано, что при введении животным холестерина происходит усиленное образование липопротеидных комплексов, включающих разные классы липидов [22], что согласуется с нашими данными, свидетельствующими о нарастании содержания в крови подопытных кроликов разного возраста триглицеридов и фосфолипидов, сочетающемся с более или менее выраженным обогащением липидами ткани печени и с увеличением в ней биосинтеза перечисленных липидных соединений.

Представленные в настоящей работе данные в целом, по нашему мнению, подтверждают полученные ранее в лаборатории результаты, свидетельствующие о большей подверженности старых животных развитию экспериментального атеросклероза [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Чеботарев Д. Ф., Фролькис В. В. Сердечно-сосудистая система при старении. Л., 1967. — 2. Горев Н. Н., Кожура И. М., Костюк Л. В. и др. Экспериментальный атеросклероз и возраст. М., 1972. — 3. McGandy R., Barrows C. — J. Geront., 1964, v. 19, p. 23. — 4. Mac Nintch J., Clair R., Lehner N. et al. — J. Lab. Invest., 1967, v. 16, p. 444. — 5. Мясников А. Л. Гипертоническая болезнь и атеросклероз. М., 1965. — 6. Крицман М. Г., Коникова А. С. Индукция ферментов в норме и патологии. М., 1968. — 7. Shore M., Zilvermit D., Ackerman R. — Am. J. Physiol., 1955, v. 181, p. 527. — 8. Swann A., Wiley M., Siperstein M. — J. Lipid Res., 1975, v. 16, p. 360. — 9. Третьякова К. А., Гродзенский Д. Э. — Биохимия, 1960, № 3, с. 399. — 10. Ballard F., Hanson R. — Biochem. J., 1967, v. 102, p. 952. — 11. Story J., Terper S., Kritchevsky D. — Lipids, 1976, v. 11, p. 623. — 12. Abell L., Brodie B., Kendall F. — Stand. Meth. clin. Chem., 1958, v. 2, p. 26. — 13. Svanborg A., Svennerholm L. — Acta med. scand., 1961, v. 169, p. 43. — 14. Чаяло П. П. — В кн.: Умственный труд и активное долголетие. Киев, 1976, с. 177. — 15. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. — J. biol. Chem., 1957, v. 226, p. 497. — 16. Алимova Е. К., Аствацатурьян А. Т. Исследование жирных кислот и липидов методом хроматографии. М., 1967. — 17. Комисаренко С. В. — Укр. біохім. ж., 1973, № 3, с. 367. — 18. Мондичюте-Эрингис Е. В. — Пат. физиол., 1964, № 4, с. 71. — 19. Карагезян К. Г. Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. Ереван, 1972. — 20. Goodman D. — Physiol. Rev., 1965, v. 45, p. 747. — 21. Крицман М. Г., Левитова Е. Н. — В кн.: Атеросклероз и тромбоз. М., 1964, с. 3.

Поступила 21/XI 1977 г.

ON THE ALTERATION IN SOME PATTERNS OF LIPID METABOLISM IN LIVER TISSUE AT EARLY STEPS OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS, DEPENDING ON AGE

P. P. Chayalo

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

Content of cholesterol, tryglycerides and phospholipids in blood and liver tissue as well as the rate of their biosynthesis in liver tissue were studied in young (8-12 months old) and old (42-48 months old) rabbits in normal state and in dynamics of experimental atherosclerosis within 10-15 and 25-30 days. The rate of biosynthesis of these lipids was decreased in liver tissue with ageing. In maintaining of animals at atherogenic diet the most distinct impairments

of lipid metabolism were observed in 42-48 months old rabbits, especially in those of the 25-30 days group. Considerable accumulation of cholesterol in liver tissue of old rabbits was accompanied by inhibition of its biosynthesis and by more distinct hypercholesterolemia in blood.

УДК 616-036.882-085.832.9-092.9

А. В. Погосова, Л. М. Петухова, В. И. Никулин, А. С. Коникова

ЗНАЧЕНИЕ ПОСТМОРТАЛЬНОГО ОХЛАЖДЕНИЯ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ОЖИВЛЕНИИ

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Установлено, что при глубокой гипотермии (10°C) включение ^{14}C -глицина в белок, РНК и ДНК в органах кроликов практически прекращается. При последующем согревании до 38°C включение метки во все исследованные биополимеры восстанавливается. Через 60—90 мин после наступления смерти кроликов от острой аноксии включение метки в белок, РНК и ДНК приближается практически к нулю во всех органах. В условиях применения искусственного постмортального охлаждения (20°C) увеличивается период сохранения жизнеспособности организма в $2\frac{1}{2}$ —3 раза, при этом создается возможность восстановления анаболических процессов.

При использовании искусственного кровообращения в сочетании с методом меченых атомов нами было показано, что после смерти кроликов, вызванной острой аноксией, органы теряют способность синтезировать белки и нуклеиновые кислоты в различные отрезки времени и к 60 мин этот процесс во всех органах практически прекращается [1—3].

Согласно результатам наших исследований, быстрое искусственное охлаждение (20°C) мертвого организма, начатое через 10 мин после смерти, дает возможность восстановить анаболические процессы и функции целостного организма при начале реанимации через 60—90 мин [4—6].

Таким образом, постмортальное охлаждение может значительно увеличить по сравнению с до сих пор известным период сохранения жизнеспособности высокоразвитого организма [7, 8].

С целью выяснения сущности действия охлаждения после наступления смерти гомойотермного организма мы провели сравнительные исследования устойчивости процессов синтеза трех основных биополимеров при глубокой гипотермии, а также после смерти от острой аноксии с применением постмортального охлаждения и без такового.

М е т о д и к а

Эксперименты проводили на кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,8—3,2 кг. Постановка опытов была аналогична описанной ранее [1]. О биосинтезе судили по включению в биополимеры ^{14}C -глицина, так как он утилизируется в качестве предшественника при построении молекул белка, РНК, ДНК. Таким путем обеспечивалась однозначность величин исходной радиоактивности в клетках при исследовании всех трех процессов. Разделение и очистку РНК и ДНК проводили по методу Шмидта и Таингаузера [9]. Количество РНК и ДНК определяли спектрофотометрическим методом по Цаневу и Маркову [10]. Белки выделяли по методу, описанному ранее [1]. Радиоактивность определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра СБС-1 с эффективностью счета по углероду 60%. В работе использовали ^{14}C -глицин с удельной радиоактивностью 170 мКи/ммоль из расчета 0,33 мКи на 1 кг массы. Всего было использовано 58 кроликов. Животные были разделены на 4 группы. 1-я — контрольные: живые кролики, перфузированные под общим наркозом при температуре 38°C оксигенированной кровью с помощью аппарата искусственного кровообращения (АИК) в течение таких же временных параметров, как и подопытные животные. 2-я — мертвые: а) при температуре тела 38°C; б) постмортально охлажденные 20°C. 3-я — кролики в состоянии глубокой гипотермии (20, 10°C): а) животные, охлажденные до 20°C либо до 10°C; б) животные, охлажденные до 20 и 10°C, а затем согреты до 38°C. 4-я — кролики, оживляемые после постмортального охлаждения и последующего согревания.

Результаты и обсуждение

Было показано (табл. 1, 2), что при гипотермии (20°C) процесс включения метки в белок замедляется в органах неравномерно, причем в наименьшей степени — в печени.

При температуре 10°C во всех органах включение изотопа в белок практически было равно нулю. Сходным образом изменялось включение метки в ДНК. При глубокой гипотермии изменения процесса включения изотопа в РНК значительно отличаются от такового для ДНК и белка. При гипотермии 20°C включение в РНК сохраняется на высоком уровне, особенно в полушариях мозга, значительно снижаясь только в сердце и полностью прекращаясь в спинном мозге. При согревании от 20 и 10 до 38°C включение

Т а б л и ц а 1

Изменение величины включения метки в белок в различных органах кроликов при глубокой гипотермии (20, 10°C) и согревании (38°C); приведены данные удельной радиоактивности белка (в имп/мин/мг)

| Орган | Контроль, 38 °C | Глубокая гипотермия | | Согревание до 38 °C | |
|----------------------|-----------------|---------------------|-------|---------------------|-------------|
| | | 20 °C | 10 °C | от 20 °C | от 10 °C |
| Сердце | 2 040±80 | 70±11 | 0 | 3 860±210 | 1 220±140 |
| Поджелудочная железа | 13 200±155 | 960±110 | 18±2 | 18 500±164 | 10 800±760* |
| Печень | 6 020±110 | 2 200±440 | 0 | 5 800±104* | 2 500±130 |
| Почки | 4 800±24 | 480±11 | 0 | 4 690±220* | 3 780±180 |
| Полушария мозга | 310±68 | 20±4 | 0 | 320±50* | 240±60* |
| Спинной мозг | 420±40 | 70±8 | 0 | 500±66* | 342±22* |

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2—4.

* $P > 0,05$; в остальных случаях $P < 0,05$, P вычислено по отношению к контрольным животным.

ние изотопа в биополимеры в большинстве органов почти полностью восстанавливается, за исключением печени. В поджелудочной железе и почках включение метки в ДНК было даже выше исходного.

По-видимому, при охлаждении гомойотермных животных остановка ассимиляторных процессов в организме происходит с сохранением способности ферментных систем катализировать процессы образования белка и нуклеиновых кислот при оксигенации и восстановлении нормальной температуры тела. Однако при охлаждении животных до 10°C включение изотопа в полимеры восстанавливалось менее полноценно, чем после охлаждения животных до 20°C.

В результате проведения аналогичных сравнительных исследований процессов включения метки в белки, РНК и ДНК после наступления смерти от острой аноксии было установлено (см. рисунок), что при температуре тела 38°C и 20°C уже через 30 мин после прекращения жизнедеятельности включение метки в белки и РНК во всех органах было резко снижено, а в ткани спинного мозга и полушариях мозга было равно нулю. Включение изотопа в ДНК восстанавливалось полностью во всех исследованных органах через 30 мин после наступления смерти. Через 60 мин после наступления смерти почти во всех органах включение метки в белок и РНК не обнаруживалось.

Таким образом, наиболее чувствительным к действию острой аноксии, как и к прижизненному снижению температуры тела гомойотермного организма, оказался процесс включения метки в ДНК.

Итак, после прекращения жизнедеятельности организма от острой аноксии имеют место однонаправленные изменения процессов включения

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -глицина в белок, ДНК и РНК, приводящие практически к остановке ассимиляторных процессов во всех органах.

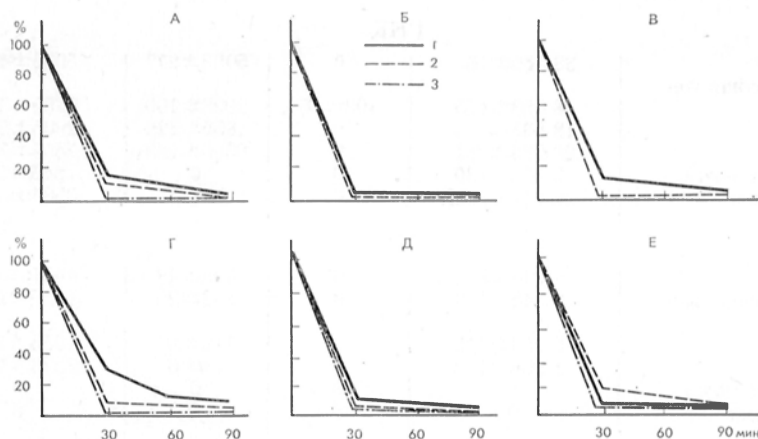
Используя ^{14}C -глицин, мы исследовали также степень восстановления включения метки в белок, РНК и ДНК у животных, которым проводили через 60—90 мин после наступления смерти длительную перфузию окси-

Т а б л и ц а 2

Изменение величины включения метки в РНК и ДНК в различных органах кроликов ($n=6-8$) при глубокой гипотермии (20, 10°C) и согревании (38°C); приведены данные удельной радиоактивности РНК и ДНК (в имп/мин/мг)

| Орган | Контроль, 38 °С | Глубокая гипотермия | | Согревание до 38 °С | |
|----------------------|-----------------|---------------------|----------|---------------------|--------------|
| | | 20 °С | 10 °С | от 20 °С | от 10 °С |
| РНК | | | | | |
| Мышца сердца | 38 150±1 626 | 9 430±460 | 3882±100 | 31 867±1 975 | 21 700±1 133 |
| Поджелудочная железа | 8 053±125 | 4 518±262 | 515±15 | 8 252±383* | 7 258±302 |
| Печень | 18 833±666 | 11 450±551 | 1847±78 | 16 367±894 | 3 700±113 |
| Почки | 20 983±384 | 11 057±390 | 3633±89 | 21 483±468* | 16 483±344 |
| Полушария мозга | 2 925±130 | 2 235±55 | 546±48 | 3 157±167* | 2 620±32 |
| Спинной мозг | 12 417±1 029 | 0 | 0 | 11 933±738* | 12 483±723* |
| ДНК | | | | | |
| Мышца сердца | 6 248±363 | 864±35 | 0 | 6 445±411* | 6 280±299* |
| Поджелудочная железа | 8 345±423 | 407±26 | 0 | 12 350±300 | 10 265±564 |
| Печень | 2 253±145 | 705±20 | 0 | 2 387±114* | 900±28 |
| Почки | 1 853±133 | 190±4 | 101±2 | 2 718±119 | 1 995±37* |
| Полушария мозга | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Спинной мозг | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

генированной кровью и другие реанимационные мероприятия.* При этом часть кроликов через 10 мин после смерти была подвергнута быстрому постмортальному охлаждению до 20°C, а других животных не охлаждали.



Изменение включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глицина в белок, РНК и ДНК в органах в различные сроки после смерти кроликов (38 и 20°C).

А — сердце; Б — полушария; В — спинной мозг; Г — поджелудочная железа; Д — печень; Е — почки. 1 — белок; 2 — РНК; 3 — ДНК. По оси абсцисс — время после наступления смерти (в мин); по оси ординат — радиоактивность (в %).

Как видно из представленных материалов (табл. 3, 4), у мертвых кроликов с прекращенными биосинтетическими процессами, не подвергавшихся искусственному постмортальному охлаждению после длительной перфузии их оксигенированной кровью, через 60—90 мин после наступления смерти процесс включения метки в белок, РНК и ДНК практически не восстанавливался. При этом не восстанавливались функции отдельных органов и целостного организма. В то же время при применении аналогич-

Т а б л и ц а 3

Влияние постмортального охлаждения на восстановление включения метки в белок в различных органах оживших и неживших кроликов ($n=6-8$); приведены данные удельной радиоактивности белка (в имп/мин/мг)

| Орган | Кролики | | | |
|----------------------|-------------------|-----------------------|---------------------------|------------|
| | контрольные живые | неохлажденные мертвые | постмортально охлажденные | |
| | | | нежившие | ожившие |
| Сердце | 2 040±80 | 0 | 640±9 | 1 800±40* |
| Поджелудочная железа | 13 200±155 | 40±2 | 5100±77 | 13 000±89* |
| Печень | 6 020±110 | 0 | 750±4 | 3 030±31 |
| Почки | 4 800±240 | 0 | 180±3 | 1 820±90 |
| Полушария мозга | 310±80 | 0 | 80±10 | 180±23 |
| Спинной мозг | 420±40 | 0 | 70±8 | 300±20 |

ных воздействий через 60—90 мин после смерти у кроликов, подвергавшихся постмортальному охлаждению, имело место восстановление с нулевого уровня процессов включения метки в белок, РНК и ДНК почти во всех органах у неживших и оживших животных. При этом у оживших живот-

Т а б л и ц а 4

Влияние постмортального охлаждения на восстановление включения метки в РНК и ДНК в различных органах оживших и неживших кроликов ($n=6-8$); приведены данные удельной радиоактивности РНК и ДНК (в имп/мин/мг)

| Орган | Кролики | | | |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------|-----------|
| | контрольные живые | неохлажден- ные мертвые | постмортально охлажденные | |
| | | | неожившие | ожившие |
| РНК | | | | |
| Сердце | 38 150±16 | 0 | 5003±277 | 5935±454 |
| Поджелудочная же- леза | 8 053±125 | 403±36 | 2998±160 | 6755±391* |
| Печень | 18 833±666 | 0 | 1855±426 | 2905±233 |
| Почки | 20 983±384 | 0 | 6305±189 | 7505±361 |
| Полушария мозга | 2 925±130 | 0 | 0 | 1242±162 |
| Спинной мозг | 12 417±1 029 | 0 | 0 | 3585±301 |
| ДНК | | | | |
| Сердце | 6 248±362 | 0 | 496±49 | 4451±335 |
| Поджелудочная же- леза | 8 345±423 | 0 | 802±25 | 1430±149 |
| Печень | 2 253±145 | 0 | 112±9 | 1955±122* |
| Почки | 1 953±133 | 0 | 74±6 | 1273±46 |
| Полушария мозга | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Спинной мозг | 0 | 0 | 0 | 0 |

ных уровень восстановления процессов включения изотопа во все указанные биополимеры был значительно выше.

У неживших кроликов относительно высокий уровень восстановления включения $1-^{14}\text{C}$ -глицина в белок отмечен только в поджелудочной железе

(40% от исходного уровня). Включение изотопа в РНК у неживших кроликов восстанавливается в ряде органов слабее, чем включение метки в белок. В спинном мозге и полушариях восстановления включения метки в РНК у неживших кроликов совсем не происходило, в то время как в почке и в поджелудочной железе этот процесс достигал значительного уровня. Восстановление включения метки в ДНК у постмортально охлажденных, но неживших животных было слабо выражено во всех исследованных органах.

При сопоставлении степени восстановления процессов включения метки в белок, РНК и ДНК в органах оживших, постмортально охлажденных животных, оказалось, что в сердце, почках и печени включение изотопа в белок и ДНК восстанавливалось в значительной степени, а включение в РНК было невысоким. В поджелудочной железе, наоборот, включение метки в белок и РНК у оживших животных восстанавливалось почти полностью, а в ДНК — незначительно. В полушариях и спинном мозге у оживших кроликов включение метки в белок и РНК восстанавливалось, а в ДНК, как и у контрольных животных, не было обнаружено.

Следовательно, в результате применения постмортального охлаждения посмертное прекращение включения метки в биополимеры — белок, РНК и ДНК — при оживлении организма обратимо через длительные сроки после наступления смерти. При этом восстановление включения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глицина в белки и нуклеиновые кислоты происходило по органам дифференцированно. При оживлении восстановление включения в белок в исследованных органах было близким к восстановлению одной из нуклеиновых кислот (либо РНК, либо ДНК). Только в больших полушариях и спинном мозге у постмортально охлажденных неживших кроликов после перфузии оксигенированной кровью частично восстанавливалось включение метки в белок при полном отсутствии включения изотопа в РНК и ДНК.

Из полученных нами данных видно, что у животных, подвергавшихся постмортальному охлаждению, незначительное восстановление включения метки в белок, а также в некоторых органах в РНК и ДНК происходило раньше восстановления жизнедеятельности организма. Только восстановление включения метки в РНК в полушариях и спинном мозге всегда сочеталось с появлением дыхания и рефлексов. По-видимому, для осуществления этих функций целостного организма необходимо наряду с биосинтезом белка наличие в мозге процесса биосинтеза РНК.

Исследования показали, что быстрое искусственное постмортальное охлаждение организма способствует после наступления смерти сохранению функций ферментных систем, катализирующих в органах процессы включения радиоактивной метки из $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глицина в белок, РНК и ДНК. Это создает возможность для восстановления метаболизма и функций целостного организма после длительного периода смерти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кони́кова А. С., Ни́кулин В. И., По́госова А. В. — Бюлл. Экспер. биол., 1971, № 9, с. 44. — 2. Кони́кова А. С., По́госова А. В., Ни́кулин В. И. et al. — Resuscitation, 1972, № 1, p. 131. — 3. Петухова Л. М. — В кн.: Актуальные вопросы современной хирургии. М., 1975, с. 241. — 4. Кони́кова А. С., По́госова А. В., Ни́кулин В. И. — Nature, New Biol., 1972, v. 236, p. 83. — 5. Кони́кова А. С., По́госова А. В., Ни́кулин В. И. — Вопр. мед. химии, 1971, № 4, с. 369. — 6. Кони́кова А. С., Петухова Л. М., По́госова А. В. — Resuscitation, 1975, v. 4, p. 125. — 7. Неговский В. А. Патифизиология и терапия агонии и клинической смерти. М., 1954, с. 73. — 8. Неговский В. А. Основы реаниматологии. М., 1975. — 9. Schmidt G., Thannhauser S. J. — J. biol. Chem., 1945, v. 161, p. 83. — 10. Tsanev R., Markov G. G. — Biochem. biophys. Acta, 1960, v. 42, p. 442.

THE IMPORTANCE OF POSTMORTAL HYPOTHERMIA FOR RESTORATION OF METABOLISM IN REANIMATION

A. V. Pogosova, L. M. Petukhova, V. I. Nikulin, A. S. Konikova

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

Incorporation of labelled metabolites into proteins, RNA and DNA was completely inhibited in rabbit tissues under conditions of prolonged hypothermia (10°). The incorporation of labelled metabolites into all the biopolymers studied was restored after subsequent warming up to 38°. Within 60-90 min after death of the animals due to acute anoxia, the labelled metabolites did not incorporate into protein, RNA and DNA. Artificial postmortal hypothermia (20°) increased (by about 2.5-3-fold) the period of viability, during which reanimation is possible. The hypothermia enables subsequent restoration of the anabolic processes from the zero level.

УДК 615.9:678.745].07:616.36-008.939.15-074

В. В. Иванов, Г. П. Кузнецова, А. И. Арчаков

СТИМУЛЯЦИЯ АКРИЛОНИТРИЛОМ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС

Красноярский медицинский институт, II Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Акрилонитрил в концентрации 1 мМ вызывает незначительное повышение скорости перекисного окисления липидов, судя по накоплению малонового диальдегида, в изолированных микросомах и оказывает выраженное прооксидантное действие в постмитохондриальной надосадочной жидкости, содержащей микросомы и клеточный сок. Акрилонитрил не образует с цитохромом р-450 комплекса с выраженными спектральными свойствами типа I или II и не стимулирует поглощения кислорода изолированными микросомами в присутствии НАДФ·Н. Токсическое действие акрилонитрила на организм, вероятно, может опосредоваться липидными перекисями.

Акрилонитрил —АН (2-пропеннитрил) — мономер, широко используемый в производстве синтетических материалов, оказывает выраженное токсическое действие на организм [1, 2]. По данным токсикологических экспериментов [1, 3], повреждающее действие этого яда обычно связывается с освобождением цианистого водорода. Изучение конкретных биохимических механизмов действия АН проводилось в единичных работах [4, 5]. До сих пор не выяснено, какие процессы играют ведущую роль в токсическом эффекте этого яда. Целью настоящей работы было изучение влияния АН на перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот липидов мембран эндоплазматического ретикулума, а также возможности связывания АН с цитохромом р-450 и окисления яда в микросомах печени.

Методика

Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 150—250 г. Животных за 24 ч до опыта лишали пищи. Субклеточные препараты получали по методу, описанному ранее [6]. Постмитохондриальную надосадочную жидкость получали центрифугированием при 10 000 g в течение 20 мин. Изолированные микросомы выделяли путем центрифугирования этой надосадочной жидкости на центрифуге ВАК-601 (ГДР) при 105 000 g в течение 60 мин. Содержание цитохрома р-450 в препаратах микросом определяли на отечественном спектрофотометре СФ-10 [6], спектр связывания АН с цитохромом р-450 регистрировали с помощью спектрофотометра «Amіnco-Chance» (США) на препаратах микросом крыс [7], индуцированных фенобарбиталом [8]. Скорость окисления АН изолированными микросомами в присутствии НАДФ·Н исследовали полярографически на полярографе LP-60 (ЧССР) со стационарным платиновым электродом закрытого типа [9]. Активность перекисного окисления липидов определяли микрометодом по количеству образовавшегося малонового диальдегида [6]. Инкубационная смесь объемом 1 мл при изучении спонтанного перекисного окисления содержала 100 мМ трис-НСl-буфер рН 7,4 и около 8 мг белка микросом или постмитохондриальной надосадочной жидкости (микросомы — клеточный сок). При изучении индуцированного перекисного окисления в пробы, содержащие 100 мМ трис-НСl-буфер рН 7,4 и 1 мМ НАДФ·Н или 0,8 мМ аскорбат, добавляли или 5 мг белка

микросом вместе с 0,012 мМ Fe²⁺ и 0,2 мМ пироглутатом натрия или только 8 мг белка постмитохондриальной надосаочной жидкости. Белок определяли по методу Лоури [10]. В таблице приведены данные средних величин, полученные на 4—8 препаратах субклеточных фракций. Каждый препарат микросом содержит материал от 2 животных.

Результаты и обсуждение

В первой части работы изучали влияние АН на перекисное окисление липидов. Из таблицы видно, что АН не оказывает влияния на перекисное окисление, индуцированное в изолированных мембранах эндоплазматического ретикулума аскорбатом или НАДФ·Н. В то же время добавление АН оказывает слабое стимулирующее действие на спонтанное перекисное окисление в препаратах микросом при инкубации в течение 2 ч (на 22%; $P < 0,01$). Во фракции клеточного сока, полученной центрифугированием при 105 000 g в течение 60 мин, наблюдалась очень низкая скорость перекисного окисления, не отличающаяся в пробах с АН от контроля (данные в таблице не приведены).

Влияние АН (1 мМ) на скорость образования малонового диальдегида в микросомах и постмитохондриальной надосаочной жидкости

| Условия опыта | Время инкубации, мин | Количество малонового диальдегида, нмоль на 1 мг белка | |
|--|----------------------|--|---------|
| | | контроль | АН |
| Микросомы + НАДФ·Н | 20 | 44±4 | 44±7 |
| Микросомы + аскорбат | 20 | 55±2 | 55±3 |
| Микросомы | 30 | 0,8±0,1 | 0,9±0,1 |
| » | 60 | 1,2±0,1 | 1,3±0,1 |
| » | 120 | 1,6±0,1 | 1,9±0,1 |
| Постмитохондриальная надосаочная жидкость | 30 | 0,5±0,1 | 0,9±0,1 |
| | 60 | 1,8±0,2 | 2,1±0,4 |
| | 120 | 2,9±0,5 | 3,1±0,4 |
| Постмитохондриальная надосаочная жидкость + НАДФ·Н | 15 | 0,4±0,1 | 0,6±0,2 |
| То же | 30 | 1,4±0,2 | 1,8±0,1 |
| » | 60 | 2,3±0,4 | 3,9±0,4 |
| Аскорбат | 15 | 0,6±0,1 | 0,6±0,2 |
| То же | 30 | 1,5±0,4 | 1,6±0,3 |
| » | 60 | 2,9±0,5 | 4,3±0,4 |

Эксперименты, выполненные на постмитохондриальной надосаочной жидкости, показали, что в этом случае стимулирующее действие АН выражено гораздо более отчетливо как при спонтанном окислении (на 60% от контроля; $P < 0,05$), так и при стимулировании перекисного окисления НАДФ·Н или аскорбатом (на 70 и 49% соответственно). Следует отметить, что в случае спонтанного перекисного окисления эффект АН снижался к 60-й минуте инкубации (различие с контролем составляло 17%; $P < 0,1$), а к 120-й минуте наблюдалась одинаковая скорость перекисного окисления в опытных и контрольных пробах. При внесении в пробу НАДФ·Н эффект АН сохранялся и на 60-й минуте. При аскорбатзависимом перекисном окислении прооксидантное действие АН обнаруживалось лишь на 60-й минуте (49%; $P < 0,02$).

Таким образом, прооксидантное действие АН отчетливо выявлено только в системе, содержащей, кроме микросом, фракцию клеточного сока. Объяснить механизм стимулирующего эффекта АН в такой сложной системе однозначно не представляется возможным. Он может быть следствием инактивирования сульфгидрильных групп тиолов клеточного сока, играющих в клетке роль антиоксидантов, или может быть результатом взаимодействия АН с истинными антиоксидантами (токоферолом, селеном и т. д.).

Во второй части работы была изучена возможность связывания АН с цитохромом *p*-450 и окисления этого яда в микросомах печени крыс. Оказалось, что АН не образует с цитохромом *p*-450 комплекса с выраженными спектральными свойствами типа I и II. Добавление АН к микросомам не приводит к инактивации цитохрома, что доказывается отсутствием искажения СО-спектра поглощения гемопротенида.

Проведенные полярографические исследования показали, что АН в концентрации 1—5 мМ не вызывает стимуляции потребления кислорода изолированными микросомами печени крыс, что указывает на отсутствие или на очень низкую скорость окисления АН в микросомах печени.

Таким образом, полученные данные позволяют считать, что АН стимулирует перекисное окисление липидов в смеси микросомы — клеточный сок. Преокидательное действие АН, по-видимому, не является прямым, а связано с его влиянием на антиоксидантную систему, локализованную в клеточном соке.

Следует подчеркнуть, что, какими бы причинами ни было вызвано ускорение реакций перекисного окисления при действии АН, полученные экспериментальные данные позволяют считать, что липидные перекиси, играющие столь важную роль в токсических эффектах ксенобиотиков [11], могут опосредовать гепатотоксическое действие АН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dudley H., Neal P. — J. industr. Hyg., 1942, v. 24, p. 27. —
2. Grahl R. — Zbl. Arbeitsmed., 1970, Bd 12, S. 379. — 3. Brieger H., Rieders F., Hodes W. — Arch. industr. Hyg., 1952, v. 6, p. 128. — 4. Соловьев Н. И. Обмен веществ головного мозга при нейротоксикациях и восстановительные процессы в мозговой ткани. Автореф. дис. докт. Томск, 1972. —
5. Gut I., Кореску J., Негудова J. et al. — Pracov. Lék., 1976, v. 28, p. 110. — 6. Арчаков А. И., Девиченский В. М., Карузина И. И. и др. — Биохимия, 1968, т. 33, с. 479. — 7. Ullrich V., Estabrook R., Schöderlin J. et al. — Hoppe-Seyler' Z. physiol. Chem., 1968, Bd 349, S. 1631. — 8. Orrenius S., Ericsson J., Ernster L. — J. Cell. Biol., 1965, v. 25, p. 627. — 9. Сергеев П. В., Халилов Э. М., Арчаков А. И. и др. — Бюлл. exper. биол., 1976, т. 86, с. 299. — 10. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265. —
11. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.

Поступила 25/XI 1977 г.

STIMULATION OF LIPID PEROXIDATION BY ACRYLONITRILE IN RAT LIVER TISSUE

V. V. Ivanov, G. P. Kuznetsova, A. I. Archakov

Medical School, Krasnoyarsk, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Acrylonitrile stimulated slightly the lipid peroxidation in isolated microsomes and exhibited distinct prooxidative effect in postmitochondrial supernatant, containing microsomes and cell juice. Acrylonitrile did not form a complex with cytochrome P-450, possessing distinct spectral properties of the I or II types, and did not stimulate the oxygen utilization by microsomes in presence of NADPH. The hepatotoxic effect of acrylonitrile appears to be due to its property to stimulate the formation of lipid peroxides in hepatocytes.

УДК 616.757.7-007.681-7:616-008.939.629-074

Т. Я. Балаба, Л. Н. Фурцева, И. Н. Шинкаренко, У. А. Абдуразаков

ОБМЕН КОЛЛАГЕНА ПРИ КОНТРАКТУРЕ ДЮПЮИТРЕНА

Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова, Москва

У больных с контрактурой Дюпюитрена снижено содержание оксипролина в ткани ладонного апоневроза и повышено его выделение с мочой. Эти изменения находятся в прямой взаимосвязи со степенью контрактуры и распространенностью патологическо-

го процесса, что свидетельствует о важной роли нарушений обмена коллагена в патогенезе контрактуры Дюпюитрена. Высказано мнение, что контрактура Дюпюитрена может рассматриваться как заболевание соединительной ткани.

Контрактура Дюпюитрена является довольно распространенным хроническим заболеванием кисти. Однако ее этиология и патогенез до настоящего времени полностью не выяснены. Наиболее обоснованным следует считать мнение, что основной причиной контрактуры Дюпюитрена является патологическое состояние соединительной ткани с ее наследственной «неполноценностью», на фоне которой под влиянием ряда разнообразных причин может возникнуть заболевание [1—3]. Эта точка зрения подтверждается данными гистохимических и биохимических исследований, выявивших при контрактуре Дюпюитрена выраженные изменения как основного вещества соединительной ткани, так и коллагена [2, 4].

Коллаген, как известно, выполняет опорную функцию в организме, особенно в костях, коже, сухожилиях, капсулах и др., и играет большую роль в жизнедеятельности этих тканей как в норме, так и при развитии патологических состояний. Нарушения обмена коллагена играют большую роль в патогенезе инфекционного неспецифического полиартрита, опухолей костной системы, несовершенного остеогенеза и других заболеваний опорно-двигательного аппарата [5—7], поэтому исследование метаболизма коллагена имеет большое значение для изучения патогенеза контрактуры Дюпюитрена.

При изучении обмена коллагена общепринятым методом считается определение оксипролина, который является естественной меткой этого белка. Как известно, весь оксипролин в тканях позвоночных находится в коллагене и, за исключением небольших количеств в эластине, не содержится ни в каких других белках [8]. Экскреция оксипролина с мочой может быть использована для оценки метаболизма коллагена как в физиологических условиях, так и при различных патологических состояниях.

Что касается биохимического исследования коллагена в ткани ладонного апоневроза при контрактуре Дюпюитрена, то в литературе по этому вопросу имеются лишь единичные работы, данные которых противоречивы. Так, при изучении химического состава ткани ладонного апоневроза у больных с контрактурой Дюпюитрена Л. И. Слуцким и Э. М. Закис [4] было отмечено значительное уменьшение содержания коллагена, в то время как результаты французских авторов [9] свидетельствуют о значительном его повышении.

Сведений об экскреции оксипролина с мочой у больных с контрактурой Дюпюитрена в доступной литературе мы не нашли. В связи с этим нами было проведено исследование содержания оксипролина в ткани ладонного апоневроза и экскреции оксипролина у больных на разных стадиях заболевания с различными степенями контрактур пальцев (по классификации Центрального научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова).

Методика

Оксипролин в ткани определяли по методу Лича [10], а его экскрецию с мочой — по методу Прокопа и Уденфренда [11] в модификации А. А. Креля и Л. Н. Фурцевой [12]. Экскрецию оксипролина с мочой исследовали у 18 здоровых и 36 больных с контрактурой Дюпюитрена (до оперативного вмешательства) в возрасте от 35 до 68 лет. Из них у 8 больных была I степень контрактуры, у 15 — II степень и у 13 — III степень. Экскрецию оксипролина исследовали после пребывания обследуемых в течение 3 дней на специальной диете, не содержащей мяса, рыбы и желатина. Содержание оксипролина в ткани ладонного апоневроза исследовали у 59 больных с контрактурой Дюпюитрена в возрасте от 24 до 69 лет. Из них у 12 больных была I степень контрактуры, у 30 — II степень и у 17 — III степень. Следует отметить, что наибольшую группу составляли больные со II и III степенью контрактуры с наличием изменений как в ладонном апоневрозе, так и в капсулах межфаланговых суставов пальцев кисти («подушечки») и у части больных в сочетании с изменениями подошвенного апоневроза. Лечение больных всех этих групп представляло

наибольшие трудности. Аналогичные исследования были проведены на 15 образцах ткани ладонного апоневроза здоровых людей в возрасте от 26 до 43 лет. Эти ткани были получены во время операции по поводу посттравматических деформаций кисти.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований экскреции оксипролина с мочой у больных с контрактурой Дюпюитрена представлены в табл. 1.

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что экскреция оксипролина с мочой у больных с контрактурой Дюпюитрена в среднем выше, чем у здоровых людей, причем с увеличением степени контрактуры и распространенности патологических изменений она возрастает. Различие между выделением оксипролина у больных с контрактурой Дюпюитрена I степени и у здоровых людей статистически недостоверно ($P > 0,5$), что свидетельст-

Таблица 1

Экскреция общего оксипролина с мочой у здоровых и больных с контрактурой Дюпюитрена

| Группа обследованных | Число обследованных | Экскреция оксипролина, мг/сут | | |
|------------------------------------|---------------------|-------------------------------|-----------|--------|
| | | пределы колебаний | $M \pm m$ | P |
| Здоровые | 18 | 11,2±38,6 | 24,4±2,1 | |
| Больные с контрактурой Дюпюитрена: | | | | |
| I степени | 8 | 17,0±39,4 | 25,5±3,8 | >0,5 |
| II степени | 15 | 15,0—56,8 | 33,1±3,5 | <0,05 |
| III степени | 13 | 19,2±71,3 | 40,3±4,5 | <0,001 |

вует о незначительном нарушении обмена коллагена у этой группы больных. Однако при II и III степени контрактуры увеличение выделения оксипролина с мочой по сравнению со средним уровнем его экскреции у здоровых людей статистически достоверно ($P < 0,05$).

Таблица 2

Содержание коллагена (по оксипролину) в ткани ладонного апоневроза у здоровых и больных с контрактурой Дюпюитрена

| Группа обследованных | Число обследованных | Оксипролин, % | | P |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|-----------|-------|
| | | пределы колебаний | $M \pm m$ | |
| Здоровые | 15 | 1,04±5,64 | 2,71±0,32 | |
| Больные с контрактурой Дюпюитрена: | | | | |
| I степени | 12 | 1,22—5,00 | 2,36—0,29 | <0,4 |
| II степени | 30 | 0,73±3,10 | 1,59±0,14 | <0,01 |
| III степени | 17 | 0,74±2,68 | 1,26±0,10 | <0,01 |

Эти данные дают основание считать, что у обследованных больных отмечается нарушение обмена коллагена, которое усугубляется по мере развития патологического процесса.

Повышенная экскреция оксипролина с мочой, как известно из данных литературы [13, 14], может быть обусловлена либо повышенным синтезом коллагена, либо усиленным его распадом. Для выяснения механизма повышенной оксипролинурии у больных с контрактурой Дюпюитрена нами были проведены исследования содержания оксипролина в ткани ладонного апоневроза.

Как видно из табл. 2, в тканях больных с контрактурой Дюпюитрена отмечается снижение содержания коллагена, выраженность которого варьи-

рует в зависимости от степени контрактуры и распространенности процесса. Так, при I степени контрактуры количество коллагена в ткани ладонного апоневроза не отличается от его уровня в здоровой ткани. При дальнейшем развитии патологического процесса, т. е. при II и III степени контрактуры, отмечается статистически достоверное снижение оксипролина по сравнению со здоровой тканью. При этом следует отметить, что сопоставление содержания оксипролина в ткани ладонного апоневроза при II и III степени контрактуры выявило существенную разницу между этими двумя группами больных ($P < 0,05$).

Из приведенных данных видно, что на фоне нарастающей по мере прогрессирования патологического процесса оксипролинурии отмечается снижение содержания оксипролина в ткани измененного ладонного апоневроза, что может свидетельствовать об усилении распада коллагена. Можно полагать, что нарушения в метаболизме коллагена играют большую роль в патогенезе контрактуры Дюпюитрена.

Выявленные нарушения в обмене коллагена и их усугубление по мере развития патологического процесса в ладонном апоневрозе у больных с контрактурой Дюпюитрена дают основание рассматривать ее как заболевание соединительной ткани, что хорошо согласуется с данными о том, что патологические процессы в ладонном апоневрозе, приводящие к развитию сгибательных контрактур пальцев, нередко сочетаются у больных с аналогичными патологическими изменениями в подошвенном апоневрозе стоп и капсуле межфаланговых суставов пальцев кисти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Skoog T. — Acta chir. scand., 1948, Suppl. 139, p. 176—190. — 2. Шинкаренко И. Н. Контрактура Дюпюитрена пальцев кисти и ее лечение с применением гиалуронидазных препаратов. Автореф. дис. канд. М., 1961. — 3. Чернавский В. А., Хамраев Ш. Ш. Контрактура Дюпюитрена и ее оперативное лечение. Ташкент, 1969. — 4. Слуцкий Л. И., Закис Э. М. — В кн.: Ревматизм (Клетки и коллоиды, корреляции и закономерности). Рига, 1966, с. 173—176. — 5. Балаба Т. Я., Зацепин С. Т., Фурцева Л. Н. — Вopr. мед. химии, 1971, № 4, с. 388—393. — 6. Балаба Т. Я., Фурцева Л. Н., Нефедьева Н. Н. — Там же, 1974, № 5, с. 471—476. — 7. Балаба Т. Я., Панова М. И., Фурцева Л. Н. и др. — Там же, 1975, № 3, с. 290—295. — 8. Neuman R. E., Logan M. A. — J. biol. Chem., 1950, v. 184, p. 299—301. — 9. Tavormina V., Rinaudo M. T. — Bull. Ass. Anat. (Nancy), 1975, N 164, p. 275—285. — 10. Leach A. A. — Biochem. J., 1960, v. 74, p. 70—81. — 11. Proctor D., Udenfriend S. — Analyt. Biochem., 1960, v. 1, p. 228—239. — 12. Крель А. А., Фурцева Л. Н. — Вopr. мед. химии, 1968, № 6, с. 635—640. — 13. Proctor D., Kivirikko K. — Ann. intern. Med., 1967, v. 66, p. 1243—1266. — 14. Weiss P. H., Klein L. — J. clin. Invest., 1969, v. 48, p. 1—10.

Поступила 25/XI 1977 г.

COLLAGEN METABOLISM IN DUPUYTREN'S CONTRACTURE

T. Ya. Balaba, L. N. Furtseva, I. N. Shinkarenko, U. A. Abdurazakov

N. N. Priorov Central Institute of Traumatology and Orthopedics, Moscow

Impairments in collagen metabolism were observed in patients with Dupuytren's contracture. These impairments were manifested as an increased excretion of hydroxyproline with urine and a decrease in content of the amino acid in tissues of aponeurosis palmaris of the patients. The alterations correlated with the damage caused by contracture. Increased catabolism of collagen appears to be the main reason of the metabolic impairments observed in Dupuytren's contracture, considering the opposite direction of changes in hydroxyproline content in urine and in aponeurosis palmaris of the patients. Impairments in collagen metabolism were of considerable importance in Dupuytren's contracture as demonstrated by the correlation between biochemical alterations and severity of the pathology. The Dupuytren's contracture might be considered as a disease affecting the connective tissue.

Л. К. Лапак, Р. В. Требухина, Ю. М. Островский

ПРЕВРАЩЕНИЯ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ,
ПОЛУЧАЮЩИХ ВЫСОКИЕ ДОЗЫ ОКСИТИАМИНА ИЛИ ТИАМИНА

Отдел регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

Введение окситиамина и тиамина крысам в дозе 400 мг на 1 кг массы в короткие сроки (3—12 ч) опыта оказывает однонаправленное (неспецифическое, некоферментное) действие на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. Через 24 и 72 ч витамин и антивитамин вызывают противоположный (специфический) эффект в отношении активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени и крови и содержания глюкозо-6-фосфата в печени и сердце. Уровень глюкозо-6-фосфата колеблется в зависимости от сроков действия окситиамина. В сердечной мышце отмечена обратная корреляция между активностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уровнем субстрата после введения как окситиамина, так и тиамина, что указывает на существенное влияние дегидрогеназных реакций на регуляцию уровня глюкозо-6-фосфата в этом органе.

Специфические функции тиаминдифосфата как кофермента, контролирующего активность транскетолазы и дегидрогеназ α -кетокислот, хорошо известны [1]. Многочисленные перестройки в обмене углеводов в связи с различной обеспеченностью организма тиаминном также описаны неоднократно [2]. Показано, однако, что изменение активности начальных этапов углеводного обмена нельзя полностью объяснить только активацией или торможением коферментзависимых реакций, особенно если речь идет о превращениях гексозофосфатов [3]. Весьма мощным и специфическим ингибитором транскетолазы — ключевого фермента пентозофосфатного цикла превращения углеводов — является окситиамин [4]. Введение этого антивитамина, особенно в больших дозах, подавляет активность упомянутого фермента в различных тканях на 30—70% в зависимости от сроков эксперимента [2], в связи с чем было решено использовать окситиамин как агент, достаточно специфически нарушающий обмен пентозофосфатов в организме животного. Учитывая, что транскетолаза в различных тканях может функционировать как фермент выработки или потребления [5] пентозофосфатов, можно было ожидать, что неспецифическое торможение этих реакций по-разному скажется на начальных этапах пентозофосфатного цикла в ткани или органе. В эксперимент включены и опыты с аналогичной дозой тиамина, поскольку неспецифические (некоферментные) эффекты витамина в углеводном обмене удастся частично дифференцировать при подобном подходе [6]. Были исследованы активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и 6-фосфоглюконата (6-ФГДГ), а также содержание глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) и никотинамидных коферментов.

Методика

Опыты поставлены на белых беспородных крысах-самках массой 180—200 г, содержащихся на обычном рационе вивария. Животные были разделены на 3 группы. В каждой группе было по 8 крыс. Животные 1-й (контрольной) группы предварительно получали ежедневно в течение 5 дней тиамин в дозе 50 мкг на 1 кг массы для исключения возможных сезонных или других гиповитаминизирующих воздействий. У крыс 2-й группы вызывали В₁-авитаминоз однократным введением окситиамина подкожно в дозе 400 мг на 1 кг массы. Крысы 3-й группы получали однократно инъекцию тиамина в той же дозе. Животных декапитировали через 3, 12, 24 и 72 ч. Ткани быстро извлекали и немедленно помещали в жидкий азот, затем определяли окисленные и восстановленные формы никотинамидных коферментов [7], Г-6-ФДГ, 6-ФГДГ [8] и Г-6-Ф [9].

Результаты и обсуждение

При общей оценке полученных данных (рис. 1, А, Б) следует обратить внимание на неспецифический (несвязанный, по-видимому, с антикофермент-

ными свойствами окситиамина) характер некоторых метаболических изменений. Действительно, активность дегидрогеназ гексозофосфатов в печени, мозге, сердце и эритроцитах через 3 и 12 ч, а в сердце через 24 ч изменяется одинаково при введении как витамина, так и антивитамина. В более поздние сроки (рис. 2), при которых неоднократно показано резко выраженное антикоферментное действие окситиаминадифосфата на уровне транскетолазы, изменения приобретают более специфический характер; эффекты витамина и антивитамина проявляются в противоположных направлениях или существенно различаются: Г-6-ФДГ и 6-ФГДГ в печени, мозге, крови через 24 и 72 ч и в сердце через 72 ч. Таким образом, в короткие сроки опыта и тиамин, и окситиамин оказывают действие или через неспецифические системы, например эндокринную, как химические стрессорные агенты, или через реакции, общие для обоих соединений, которые можно считать некоферментными: участие в обмене макроэргических фосфатов [10, 11] или в окислительно-восстановительных процессах [6].

Первое предположение встречает, однако, серьезные возражения, поскольку было показано, что через 1 сут после однократного введения тиамин или окситиамина в дозе 400 мг/кг содержание кортикостероидов в крови и ткани надпочечника в большой мере зависит от вводимого препарата: витамин стимулирует биосинтез кортикостероидов и выброс их в кровь, а антивитамины — угнетает [12]. Изучение содержания кортикостероидов в ткани надпочечника и крови мышей при остром окситиаминовом V_1 -авитаминозе показало также, что в первые 12—24 ч наблюдается резкое снижение биосинтеза кортикостероидов в надпочечниках и соответственно уменьшается их выброс в кровь [12], что само по себе объясняет наблюдаемое в течение первых суток накопление восстановленных форм никотинамидных коферментов в крови ($\text{НАД} \cdot \text{H}_2 + \text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ в норме $38,3 \pm 2,1$ мкг на 1 г ткани, в опыте $55,3 \pm 2,5$ мкг на 1 г ткани; $P < 0,001$). Через 72 ч биосинтез стероидов [12] приближается к исходному с тенденцией к дальнейшему повышению. В соответствии с уровнем стероидных гормонов при остром V_1 -авитаминозе находится активность дегидрогеназ через 24 и 72 ч после действия антивитамина: наиболее отчетливо реагировала Г-6-ФДГ печени и крови и 6-ФГДГ печени (см. рис. 2, Б, Г). Самое глубокое угнетение дегидрогеназных реакций в печени к 24-му часу связано с изменением уровня $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ в этот срок (см. таблицу). К 72 ч упомянутые показатели, как и биосинтез стероидных гормонов, приближаются к исходному уровню. Активация обеих НАДФ -зависимых дегидрогеназ к 12-му часу опыта и угнетение их к 24-му часу в печени после инъекции окситиамина отразились на содержании окисленной и восстановленной форм

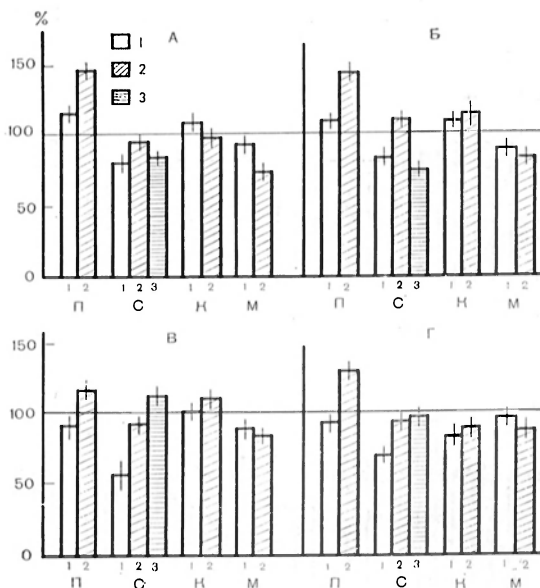


Рис. 1. Активность Г-6-ФДГ в печени (П), сердце (С), мозге (М) и крови (К) крыс через 3 (1), 12 (2) и 24 (3) ч после введения тиамин (А) или окситиамина (Б) в дозе 400 мг на 1 кг массы и 6-ФГДГ после введения тиамин (В) или окситиамина (Г) в тех же дозах.

их кофермента (см. таблицу). На протяжении всего опыта, длившегося 72 ч после введения препарата, отмечалась прямая корреляция в печени между активностью 6-ФГДГ и содержанием НАДФ·Н₂ ($r=+0,98$, $P=0,017$), а также некоторая связь между активностью Г-6-ФДГ и содержанием НАДФ·Н₂ ($r=+0,7620$, $P>0,2$) и между активностью обеих дегидрогеназ ($r=+0,9073$, $P>0,1$).

Уровень Г-6-Ф в тканях колеблется в зависимости от сроков действия окситиамина. Накопление Г-6-Ф в печени через 3 ч после введения анти-

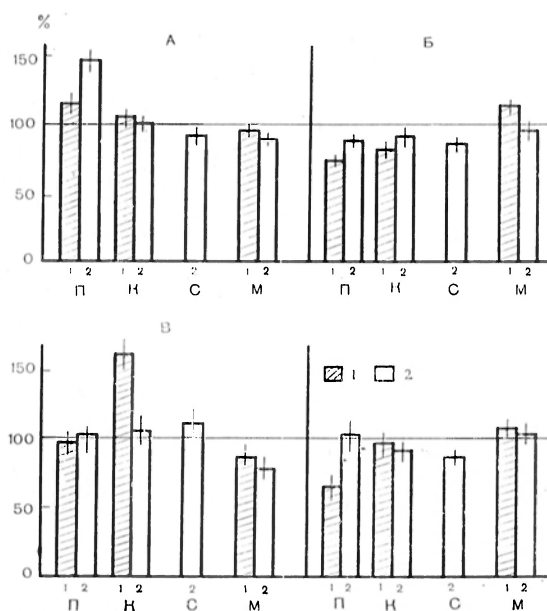


Рис. 2. Активность Г-6-ФДГ в печени (П), сердце (С), мозге (М) и крови (К) крыс через 24 (1) и 72 (2) ч после введения тиамина (А) или окситиамина (Б) в дозе 400 мг на 1 кг массы и 6-ФГДГ после введения тиамина (В) или окситиамина (Г) в тех же дозах.

накопление гликогена в печени. Высказывалось мнение, что это связано с угнетением фосфорилазной реакции, так как фермент реагировал сходным образом на витамин В₁ *in vitro* [14].

В короткие сроки опыта инъекции тиамина несколько угнетают фосфогексоизомеразу, а к 12 ч Г-6-ФДГ (см. рис. 1, А), глюкозо 6-фосфатаза и фосфогексоизомеразы уже активируются. Таким образом, концентрация Г-6-Ф в печени на фоне введения высокой дозы тиамина (см. рис. 3) отражает итог многих метаболических взаимодействий, точный учет которых достаточно труден, а иногда и условен.

Неоднократно показано, что окситиамин не проникает в головной мозг через гематоэнцефалический барьер [4] и его антивитаминозное действие в отношении этого органа носит в связи с этим своеобразный характер. В известной мере этим обстоятельством можно объяснить относительную стабильность исследованных нами показателей (см. рис. 1, Б, Г, рис. 2, Г), хотя в отдельные сроки наблюдалось изменение активности дегидрогеназ и уровня Г-6-Ф. Учитывая особую зависимость головного мозга от углеводного обмена [15] и показанное ранее [13] угнетение транскетолазы в этой ткани через 24 ч после инъекции окситиамина, можно полагать, что изменения в обмене Г-6-Ф обусловлены не прямым действием окситиамина, а опосредованы путем создания в целом организме гиповитаминозного фона [16], сопровождающегося гипергликемией [17].

Уровень Г-6-Ф в тканях колеблется в зависимости от сроков действия окситиамина. Накопление Г-6-Ф в печени через 3 ч после введения анти-витамина (рис. 3), по-видимому, связано с регулирующей ролью печени в поддержании пируватемии, поскольку именно в этот срок окситиамин наиболее сильно угнетает пируватдегидрогеназу [13], в результате чего гликолитическое расщепление Г-6-Ф, по-видимому, затормаживается. Самый низкий уровень субстрата через 1 сут после инъекции антивитамина обусловлен снижением активности ферментов, участвующих в образовании Г-6-Ф — глюкокиназы и фосфоглюкомутазы. Через 72 ч уровень Г-6-Ф определяется снижением его утилизации в пентозном цикле (см. рис. 2) и гликолизе [13]. При объяснении некоторых изменений уровня Г-6-Ф в печени при введении тиамина следует, видимо, учитывать некоторые обстоятельства. Так, избыток витамина стимулирует на-

В сердечной мышце в течение 3 сут обнаружена обратная корреляция между активностью Г-6-ФДГ и уровнем Г-6-Ф при действии тиамин ($r=-0,8589$, $P=0,2$) и окситиамина ($r=-0,94$, $P=0,05$), что указывает на существенное влияние дегидрогеназных реакций на регуляцию уровня Г-6-Ф.

Содержание НАДФ·Н₂ (в мкг на 1 г ткани или 1 мл крови) в тканях крыс через 12, 24 и 72 ч после введения тиамина или окситиамина в дозе 400 мг на 1 кг массы

| Время после введения, ч | | Окситиамин | Тиамин | | | |
|-------------------------|---|------------|--------|----------|----------|----------|
| | | печень | печень | сердце | кровь* | мозг |
| 12 | P | 210±19 | 241±22 | 47,8±3,7 | 55±6 | 9,2±0,77 |
| | | >0,5 | >0,2 | <0,01 | <0,02 | >0,2 |
| 24 | P | 207±15 | 210±14 | 43,2±2,2 | 38,3±3 | 7±1,2 |
| | | 171±8 | 238±5 | 28,8±1,7 | 36±1,3 | 7,5±1,5 |
| 72 | P | <0,05 | >0,05 | <0,001 | >0,2 | >0,5 |
| | | 202±15 | 258±14 | 30,6±1,9 | 37,4±1,6 | 6,6±1,1 |
| | P | >0,5 | <0,05 | <0,01 | >0,5 | >0,5 |
| До введения | | 206±17 | 206±17 | 32,9±2,7 | 37,2±2,7 | 8,3±0,77 |

* Восстановленные формы никотинамидных коферментов в крови определены суммарно (НАД·Н₂ + НАДФ·Н₂).

Низкое содержание НАДФ·Н₂ в сердце после введения тиамина в более поздние сроки вызвано, по-видимому, усиленным потреблением восстановленного кофактора в липидном обмене [18] или изменением других, более существенных для обмена НАДФ в сердце систем (реакции цикла трикарбоновых кислот, трансгидрогеназы) [19—20].

Изучение содержания Г-6-Ф в тканях после введения обоих препаратов (см. рис. 3) показало, что в ткани сердца ($P<0,001$) окситиамин особенно резко изменяет его на протяжении всех 72 ч опыта, в печени ($P<0,05$) — начиная с 12 ч и до конца опыта, в мозге ($P<0,001$) — только через 24 ч.

Если обратить внимание на общие закономерности в изменении уровня Г-6-Ф в мозге, сердце и печени, то нужно признать, что специфически зависимые от витаминных свойств вводимых препаратов изменения весьма немногочисленны (печень 24 ч) (см. рис. 3). Это дает основание утверждать, что перестройки в обмене Г-6-Ф, возникающие в результате введения высокой дозы витамина или антивитамина, обусловлены, как это уже отмечалось нами и для Г-6-ФДГ, скорее некоферментной активностью препаратов [2], чем их влиянием на уровень и активность тиаминдифосфата.

Превращения и уровень Г-6-Ф в печени, сердце, мозге и эритроцитах крыс при однократном введении большой дозы тиамина или окситиамина в короткие сроки опыта (3—12 ч) в большинстве случаев изменяются сходным образом, что указывает на неспецифический, невитаминный, характер влияния указанных препаратов на протекание начальных этапов пентозо-

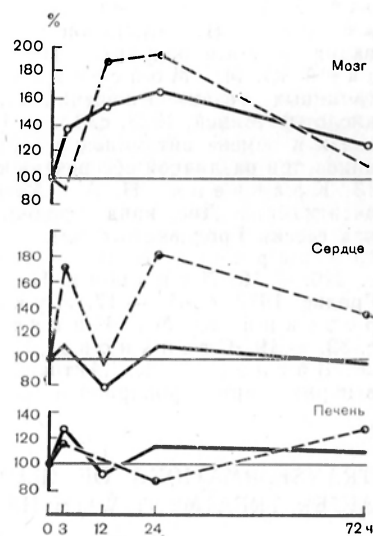


Рис. 3. Содержание Г-6-Ф в тканях крыс после введения тиамина (сплошная линия) или окситиамина (пунктирная линия) в дозе 400 мг на 1 кг массы.

Кружки — статистически значимые изменения.

фосфатного и гликолитического пути обмена углеводов. Только в период 24—72 ч, когда проявляется выраженное антикоферментное действие окситиамина в отношении транскетолазы, витамин и антивитамин вызывают противоположный эффект в отношении активности Г-6-ФДГ в печени и крови и уровня Г-6-Ф в печени и сердце.

Высокие дозы тиамина и окситиамина не вызывают резких изменений в распределении восстановленных и окисленных никотинамидных коферментов в исследуемых тканях. После введения тиамина имеется однако явное несоответствие между количеством НАДФ·Н₂ и активностью дегидрогеназ гексозофосфатов в сердце и мозге к 12—72 ч и в крови к 12—24 ч, что свидетельствует о более сильном влиянии витамина на другие процессы, связанные с образованием и потреблением НАДФ·Н₂, особенно в сердце. Общая оценка полученных данных свидетельствует о наличии двух факторов в действии высоких доз тиамина и окситиамина на организм животного: вмешательство в обмен по неспецифическим, некоферментным, механизмам в короткие сроки опыта (3—12 ч) и по специфическим, витаминным и антивитаминным, в более поздние.

ЛИТЕРАТУРА

1. Racker E., Naba G., Leder J. G. — J. Am. Chem. Soc., 1953, v. 75, p. 1010. — 2. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамина. Минск, 1975, с. 182. — 3. McCandles D. W., Cassidy C. — Biochem. Med., 1975, v. 14, p. 384. — 4. Островский Ю. М. Антивитамины в экспериментальной и лечебной практике. Минск, 1973, с. 146. — 5. Северин С. Е., Степанова Н. Г. — Биохимия, 1973, т. 38, с. 583. — 6. Островский Ю. М. Тиамин. Минск, 1971, с. 62, 107. — 7. Lowry H. L., Passoneau J. V., Schulz D. W. et al. — J. biol. Chem., 1961, v. 236, p. 2746. — 8. Захарьин Ю. Л. — Лабор. дело, 1967, № 6, с. 327. — 9. Hohorst H. J., Kretz F. H., Bücher Th. — Biochem. Z., 1959, Bd 332, S. 18. — 10. Разумович А. Н. Отношение обмена тиамина к реакциям окисления и фосфорилирования в митохондриях. Дис. канд. Гродно — Минск, 1963. — 11. Островский Ю. М., Мойсеев А. Г., Мажуль А. Г. и др. Механизмы межвитаминных взаимоотношений (Тиамин, пиридоксин, пантотеновая и никотиновая кислоты). Минск, 1973, с. 15. — 12. Виноградов В. В. К механизмам взаимосвязи в обмене витаминов и гормонов: функциональная активность коры надпочечников при различной обеспеченности организма тиамином. Дис. канд. Гродно, 1968. — 13. Кравченя Н. А. Антивитаминная активность различных производных окситиамина. Дис. канд. Гродно, 1974. — 14. Лукашик Н. К. — В кн.: Научная сессия Гродненского мед. ин-та. 5-я. Тезисы докладов. Минск, 1964, с. 184. — 15. Спиричев В. Б. — В кн.: Молекулярные основы патологии. М., 1966, с. 220. — 16. Лукашик Н. К. — В кн.: Симпозиум по тиамину. 2-й Материалы. Гродно, 1972, с. 65. — 17. Лукашик Н. К. и др. — Там же, с. 67. — 18. Островский Ю. М., Никитин В. С. — Бюлл. exper. биол., 1963, № 10, с. 32. — 19. Степанова Н. Г. — Вопр. мед. химии, 1969, № 4, с. 346. — 20. Вагнер В. К. Активность некоторых ферментов пентозофосфатного цикла в норме и при коронарной недостаточности. Автореф. дис. канд. Л., 1966.

Поступила 25/XI 1977 г.

TRANSFORMATIONS OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE IN MAMMALIAN TISSUES AFTER TREATMENT WITH HIGH DOSES OF HYDROXYTHIAMIN OR THIAMIN

L. K. Leshak, R. V. Trebukhina, Yu. M. Ostrovsky

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

Administration of hydroxythiamin or thiamin into rats at a dose 400 mg/kg body weight caused a single-directed (unspecific, nonenzymatic) effect on the activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases within short periods (3-12 hrs). Within 24 and 72 hrs the effects of vitamin and antivitamin acquired the opposite (specific) direction towards the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in liver tissue and blood and towards content of glucose-6-phosphate in heart and liver tissues. Content of glucose-6-phosphate was altered depending on time of hydroxythiamin effect. Reverse correlation between the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and content of the substrate was observed in heart muscle either after administration of hydroxythiamin or thiamin; the phenomenon suggest that dehydrogenase reactions affect considerably the regulation of glucose-6-phosphate content in the tissue.

О. Г. Косик, Г. В. Троцкий, В. Г. Павлюк, К. Д. Галахин, М. К. Тоскина

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНА G ИЗ СЫВОРОТКИ ТИРЕОИДЭКТОМИРОВАННЫХ КРОЛИКОВ

Кафедра биохимии Крымского медицинского института, Симферополь

Методами кругового оптического дихроизма, спектрополяриметрии (в видимом и ближнем УФ-свете) и изоэлектрического фокусирования выявлены физико-химические и конформационные отличия иммуноглобулина G из сыворотки крови тиреоидэктомированных кроликов от белка крови контрольных животных. Эти отличия трактуются как появление необычных «патологических» белков при патологии.

Ранее нами были опубликованы данные о модификации γ -глобулина из сыворотки крови человека при патологии и животных в эксперименте [1—4]. Суждения о модификации белка были основаны на результатах, полученных при измерении дисперсии оптического вращения в ближней и дальней УФ-областях спектра.

В настоящей работе эти исследования продолжены с привлечением новых методов, позволяющих подойти к решению вопроса о природе найденных ранее изменений в молекуле белка. Эти изменения могут быть следующими: 1) накопление преимущественно одной из обычно существующих фракций белка, прежде содержащейся в незначительном количестве в общем фонде иммуноглобулинов; 2) появление измененного белка, сопровождающее естественные процессы жизнедеятельности организма, как механизм самообновления живой материи [5, 6] или как вариант регуляции метаболизма белков [7, 8]; 3) накопление необычного для физиологического состояния организма «патологического» белка [9].

Методика

В опытах были использованы кролики породы шиншилла со средней массой 2,5 кг, у которых производили тотальную тиреоидэктомию. При этом оставляли нетронутыми задние и передние паращитовидные железы. Контролем служили животные с «ложной» тиреоидэктомией — повторение всех этапов операции без удаления щитовидной железы. Животных обеих групп (по 10 кроликов) во время эксперимента содержали в одинаковых условиях. О развитии явлений гипотиреоза судили по следующим признакам: к концу первого месяца после операции уровень холестерина и β -липопротеидов резко увеличился; к этому времени в сыворотке крови возросло содержание ионов Na^+ , Ca^{2+} и хлоридов; основной обмен значительно снизился (30% и более); на ЭКГ было отмечено уменьшение амплитуды зубцов и укорочение интервалов между ними.

Кровь брали из краевой ушной вены без применения консервантов через 1 $\frac{1}{2}$ и 6 мес после тиреоидэктомии. Непосредственным объектом исследования служила электрофоретическая фракция γ -глобулина, полученная препаративно из сыворотки крови в геле агар-агара с последующим вымораживанием [10]. Растворы этих белков были тщательно диализованы против 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4 с последующей фильтрацией через фильтры «Millipore».

При постановке реакции иммунопреципитации с полипреципитирующей сывороткой против белков крови кролика производства Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии (НИИЭМ) им. Н. Ф. Гамалеи во всех образцах (за исключением двух) отмечена одна четкая линия, идентичная полученной со стандартным раствором иммуноглобулина. В двух образцах отмечены следы примеси других белков в лунке с цельным раствором, однако уже при разведении в 2 раза преципитации не наблюдалось. В последующем электрофоретические образцы дополнительно очищали ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе (фирма «Whatman», Англия), уравновешенной 0,0175 М фосфатным буфером pH 6,3.

Измерения оптического кругового дихроизма (КД) проведены с помощью прибора Dichrographe 111, фирма «Юнап» (Франция) в кювете 0,5 см при чувствительности 5×10^{-6} град/мм. Молекулярную эллиптичность [0] определяют по формуле [11]:

$$[0] = \frac{\Delta D \cdot M}{c \cdot d \cdot 10} = E \times 3300,$$

где [0] — молекулярная эллиптичность (в град·см⁻²/дцмоль); ΔD — измеряемая оптиче-

ская плотность КД (в град/мм); M — средняя масса аминокислотного остатка, принятая равной 109; c — концентрация исследуемого образца (в моль/л); d — длина пути света, проходящего через раствор (в см); E — циркулярно-дихроичное поглощение.

Кроме того, по данным молекулярной эллиптичности была предпринята попытка рассчитать содержание упорядоченных структур в молекуле белка по уравнению, предложенному в работе [12]. Концентрацию растворов для измерения КД при 280 нм определяли в спектрофотометре «Бескман», модель 25 (США), с учетом $E_{1\%}^{1\text{см}}$ для IgG, равной 14,0. Определение дисперсии оптической активности в видимом и ближнем УФ-свете и

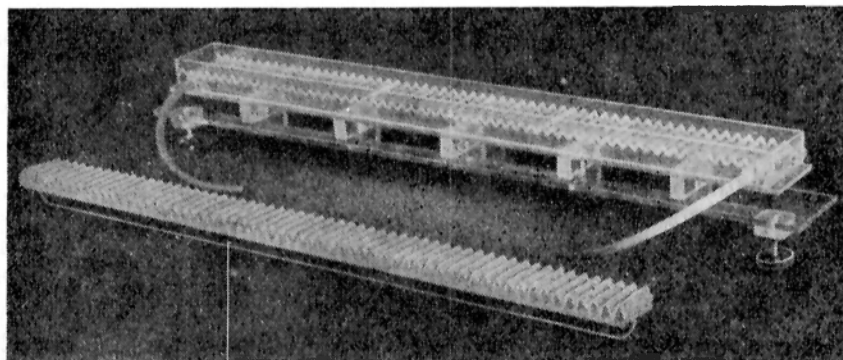


Рис. 1. Горизонтальный многоячейный аппарат для изоэлектрического фокусирования.

расчеты спектрополяризметрических параметров белка выполнены на фотоэлектрическом спектрополяриметре, как описано ранее [13, 14]. Изоэлектрическое фокусирование осуществлено в многоячейном горизонтальном аппарате [15] (рис. 1), модифицированном нами так, что одновременно в идентичных условиях могли быть исследованы два образца. Использовали 1% раствор амфолинов (Швеция) с интервалом рН 3,0—10,0 при среднем падении напряжения в аппарате 20 В/см. Продолжительность опыта 72 ч. По окончании электрофокусирования в каждой из 60 ячеек измеряли рН на рН-метре-340 и поглощение при 280 нм в спектрофотометре СФ-16. По полученным данным строили графики распределения изоэлектрических фракций белка в градиенте рН, т. е. изоэлектрический спектр (ИЭС).

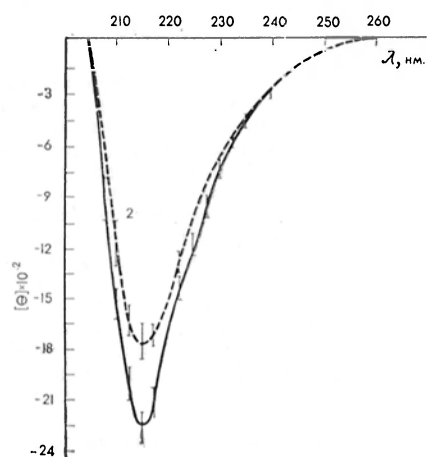


Рис. 2. Кривые молекулярной эллиптичности КД электрофоретических фракций γ -глобулина из сыворотки крови кроликов.

1 — спустя 6 мес после тиреоидэктомии; 2 — контроль.

молекулярной эллиптичности имеют общую тенденцию к углублению отрицательного максимума поглощения при 215 нм по сравнению с исходными данными у контрольных животных (различия статистически достоверны).

На рис. 3 приведены кривые молекулярной эллиптичности фракций IgG, полученных ионообменной хроматографией. Следует подчеркнуть,

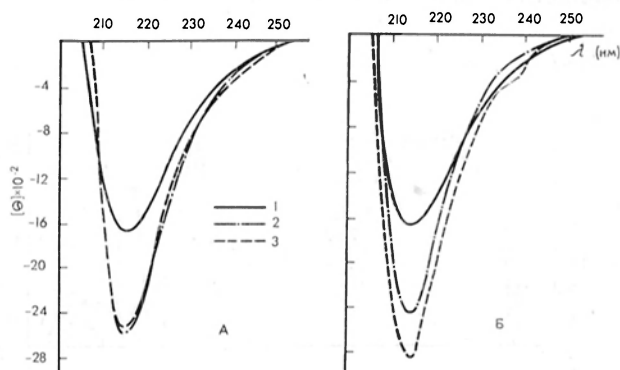
Кроме того, произведена оценка количественного распределения IgG в ИЭС методом радиальной иммунодиффузии [16] содержимого каждой ячейки против моноспецифической ослиной анти-IgG-сыворотки кролика, полученной из лаборатории люминесцентных сывороток НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. По квадратам диаметров зон преципитации построены графики распределения IgG в градиенте рН, которые мы называли иммуноизоэлектрическим спектром (ИИЭС).

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены усредненные кривые КД электрофоретических фракций γ -глобулина из сыворотки крови кроликов спустя 6 мес после тиреоидэктомии. Как видно, кривые молекулярной эллиптичности имеют общую тенденцию к углублению отрицательного максимума поглощения при 215 нм по сравнению с исходными данными у контрольных животных (различия статистически достоверны).

что здесь осуществлено сравнительное изучение белка от одного животного (каждого) индивидуально, а не между белками отдельных кроликов, т. е. электрофоретический образец сравнивается с фракцией, полученной из него же на ДЭАЭ-целлюлозе. Как видно на рис. 3, А, кривые КД электрофоретических фракций из сывороток крови кроликов спустя 1½ и 6 мес после тиреоидэктомии практически идентичны. КД ДЭАЭ-фракций показывает большее углубление отрицательного максимума у животных со сроком после операции 6 мес. К этому времени выявлена четкая тенденция к ухудшению состояния кроликов (они малоподвижны, тучные, некоторые агрессивны).

Рис. 3. Кривые молекулярной эллиптичности КД фракций IgG, полученных ионообменной хроматографией. А — КД электрофоретических фракций белка; Б — КД ионообменных фракций. 1 — контроль; 2 — 1½ мес после тиреоидэктомии; 3 — 6 мес после операции.



В таблице представлены данные спектрополяризметрических измерений. Можно отметить, что оптические параметры γ-глобулинов кроликов через 6 мес после удаления щитовидной железы существенно отличаются от таковых белков контрольных животных. Особенно резко снижен параметр λ_c — до 142 нм, параллельно отмечается существенное увеличение a_0 (до —375), а также появление необычных для нормы высоких положительных значений b_0 (до +128). Рассчитанное по этим данным содержание упорядоченных структур в молекуле исследуемого белка показывает наличие значительных конформационных отличий. Возрастание a_0 и появление таких положительных значений b_0 можно трактовать как явление деспирализации (при небольшом увеличении β-структур). Спектрополяризметрические данные образцов из сыворотки крови животных спустя 1½ мес после операции сходны с таковыми у контрольных животных.

Спектрополяризметрические характеристики γ-глобулина из сыворотки крови кроликов спустя 6 мес после операции

| Группа животных | λ_c , нм | a_0 | b_0 | H, % | B, % |
|-----------------|------------------|-------|-------|------|------|
| Контрольная | 214 | —290 | 0 | 19 | 28 |
| Опытная | 205 | —320 | +60 | 11 | 31 |
| Контрольная | 216 | —293 | +10 | 20 | 28 |
| Опытная | 216 | —340 | +40 | 12 | 28 |
| Контрольная | 212 | —290 | 0 | 19 | 28 |
| Опытная | 195 | —375 | +90 | 5 | 29 |
| Контрольная | 212 | —292 | 0 | 19 | 29 |
| Опытная | 142 | —347 | +128 | 3 | 34 |
| Контрольная | 213 | —300 | +10 | 19 | 31 |
| Опытная | 190 | —350 | +90 | 6 | 31 |

Примечание. λ_c , a_0 и b_0 — спектрополяризметрические константы; H и B — содержание α-спиралей и β-структур соответственно.

На рис. 4, А представлена типичная кривая изоэлектрического фокусирования, полученная нами для γ-глобулина из сыворотки крови кроликов контрольной группы. Как видно на рис. 4, белок фокусируется главным пиком с pI 6,6 несколькими мелкими пиками в щелочной (pI от 7,5

до 9,0) и в кислой (рI от 5,5 до 4,0) зонах. Распределение IgG в ИЭС по иммунодиффузии (ИИЭС) практически соответствует распределению белка по оптической плотности как по положению, так и по относительной высоте максимумов.

На рис. 4, Б—Е представлено фокусирование белков крови экспериментальных животных. Образцы также фокусируются в основном одним главным пиком и несколькими небольшими дополнительными. Однако здесь имеет место существенное отличие ИЭС всех исследуемых образцов подопытных животных от ИЭС контрольного IgG. Характерно кислое зна-

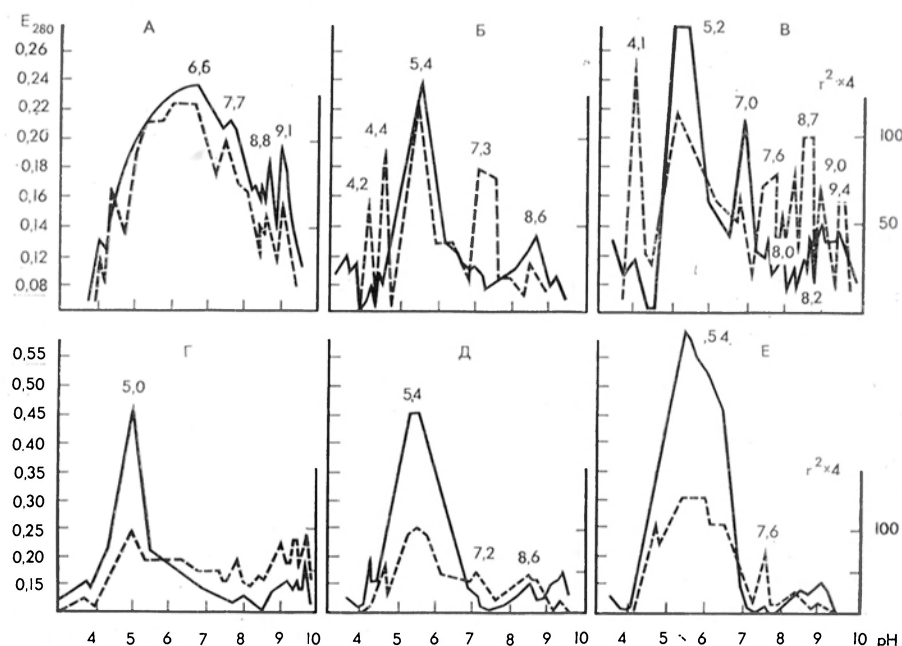


Рис. 4. ИЭС (сплошная линия) и ИИЭС (пунктирная линия) γ -глобулина.
А — контроль; Б — Е — опыт.

чение рI основного пика — рН от 5,0 до 5,4. Кроме того, необычны ИИЭС: для отдельных пиков оптической плотности нет соответствия в соотношении максимумов зон преципитации. Здесь на фоне незначительной оптической плотности по поглощению при 280 нм обнаруживаются высокие максимумы иммунной преципитации.

Изложенные выше данные еще раз показывают наличие определенных изменений в структуре иммуноглобулина кроликов при поражении щитовидной железы. Изучение электрофоретической фракции γ -глобулина из сыворотки тиреоидэктомированных животных выявило ряд необычных для нормы физико-химических особенностей: углубление максимума дихронического поглощения при 215 нм, резкое изменение спектрополяризметрических параметров, смещение изоэлектрической точки основного пика в кислую область рН; несоответствие иммуноизоэлектрических спектров изоэлектрическим. Указанные особенности, вероятно, могут быть объяснены несколькими причинами.

Если рассматривать электрофоретически полученный γ -глобулин как сумму большого числа индивидуальных антител, то следует допустить возможность определенных отличий между ними по отдельным свойствам. Эта точка зрения в последнее время получила многочисленные экспериментальные подтверждения. Так, найдено, что очищенные кроличьи антитела дают более глубокий отрицательный максимум, чем обычный кроличий

γ -глобулин при исследовании КД [17]. Из 9 изучаемых человеческих миеломных белков для 8 определено гораздо большее значение [0], чем для нормального человеческого IgG [18]. Авторы приходят к выводу, что все очищенные антитела должны проявлять большие значения молекулярной эллиптичности, чем нормальный пул.

Наряду с этим ряд исследователей [19, 20], изучая миеломные белки, нашли и уменьшение, и увеличение [0] при 215—217 нм по сравнению с нормальными иммуноглобулинами. В эксперименте [21] показано, что характеристики КД специфически очищенных антител от нескольких отдельных кроликов имеют значительные вариации в молярной эллиптичности в сторону как ее уменьшения, так и увеличения.

Подобную картину наблюдали и мы при измерениях КД электрофоретических и очищенных на ДЭАЭ-целлюлозе образцов иммуноглобулинов. Интересен также факт взаимосвязи изменений данных КД и спектрополяриметрии. Из теоретических обоснований механизма возникновения отрицательного максимума при 215—217 нм следует, что чем глубже негативная [0], тем больше число β -складчатых структур в молекуле. Изменения структур, рассчитанные нами по дисперсии оптического вращения (ДОВ), касаются в основном изменений в содержании α -спиралей при определенном росте β -структур. Представления об α -спиральности в иммуноглобулине сейчас не вызывают сомнений. Так, известно, что иммуноглобулины содержат α -спиральные участки как в *Fab*-, так и в *Fc*-фрагментах в общей сложности в количестве, соответствующем полученному нами. Тем не менее количественно сопоставить и оценить степень упорядоченности по β -структуре данные КД и ДОВ не представляется возможным. Попытка рассчитать эти структуры по КД по предложенному в последнее время уравнению [12] оказалась безуспешной, по нашему мнению, из-за неудачного выбора авторами реперных белков и неучета аминокислотного состава и особенностей β -структур в доменах IgG. Поэтому необходимы другие модели или совершенно новые подходы к таким расчетам.

Вполне допустимым, на наш взгляд, является и иное объяснение полученных данных. В случае повреждения щитовидной железы, например при ее удалении, резкий гормональный дисбаланс всегда сопровождается нарушениями биосинтеза белков крови [22] и иммуно- и аутоиммунологической перестройкой организма. При этом велика реальность развития аутоиммунных процессов с появлением большого числа иммунных комплексов [23, 24] с извращением катаболизма белков, клеточного протеолиза.

В этом плане весьма интересным является обнаруженное нами в эксперименте несоответствие ИИЭС изoeлектрическим по соотношению максимумов (см. рис. 4, *Б* — *Е*). Создается впечатление, что в данном случае происходит изменение физико-химических свойств отдельных изoeлектрических фракций. В силу этого возникают определенные особенности иммунохимического выявления IgG методом радиальной иммунодиффузии. Эти особенности могут быть обусловлены конформационными изменениями в молекуле белка с появлением необычной жесткости или гибкости ее или иммунными комплексами с потерей «аффинности», отличными по *pI* от исходного иммуноглобулина. В этом плане известно, что при тиреотоксикозе у людей накапливаются щелочные фракции глобулинов [25], хотя это скорее всего соответствует накоплению подклассов G_2 , G_4 . В этом случае можно предположить, что гормональный дисбаланс опосредован через системы биосинтеза белков [26, 27].

Таким образом, полученные нами данные наводят на мысль о возможности появления необычных, «патологических» белков при заболеваниях. Они могут представлять в первую очередь иммунные комплексы, характерные для отдельных заболеваний, их длительности и тяжести течения с последующим вовлечением процессов протеолиза. Последнее особенно существенно, так как сейчас известно, что началу катаболизма белков предшествует их модификация, сопровождающаяся приобретением более кислых

значений рI. К сожалению, для однозначного суждения по этому вопросу проведенных экспериментов еще недостаточно. Однако они позволяют наметить план проведения последующих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Косик О. Г., Доценко С. М. — В кн.: Вопросы медицинской теории, клинической практики и курортного лечения. Симферополь, 1969, вып. 3, с. 73. — Косик О. Г. — Там же, с. 75. — 3. Косик О. Г. — В кн.: Молекулярная биология. Киев, 1972, вып. 8, с. 122. — 4. Косик О. Г., Сербникова Т. А., Мерзлов В. П. и др. — Вopr. мед. химии, 1972, № 6, с. 597. — 5. Гулы М. Ф. Природа и биологическое значение некоторых метаболических приспособительных реакций организмов. Киев, 1977, с. 6—19. — 6. Гулы М. Ф. — Укр. биохим. ж., 1953, т. 25, с. 367. — 7. Schimke R. T. — In: Mammalian Protein Metabolism. Ed. H. N. Munro. New York, 1970, p. 177—277. — 8. Прокopenко Л. Г., Равич-Щербо М. И. Обмен иммуноглобулинов. М., 1974, с. 155—173. — 9. Троицкий Г. В. — В кн.: Молекулярная биология. Киев, 1972, вып. 8, с. 9. — 10. Косик О. Г. Дисперсия оптического вращения белков сыворотки крови при сахарном диабете, экспериментальном гипотиреозе и после общего облучения рентгеновскими лучами. Дис. канд. Симферополь, 1970, с. 48—51. — 11. Веллюз Л., Легран М., Грожан М. Оптический круговой дихроизм. М., 1967, с. 103—107. — 12. Rosenkranz H. — Z. klin. Chem. klin. Biochem., 1974, Bd 12, S. 415—422. — 13. Троицкий Г. В., Кобозев Г. В. — Биохимия, 1963, т. 28, № 6, с. 992—998. — 14. Троицкий Г. В. — В кн.: Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. М., 1967, с. 19—25. — 15. Valmet E. — Sci. Tools, 1969, v. 16, p. 1. — 16. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F. — Immunochemistry, 1965, v. 2, p. 235. — 17. Cathou R., Kulczycki A., Haber E. — Biochemistry, 1968, v. 7, p. 3958. — 18. Frommel D., Litman G., Terry W. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1970, 221, p. 399. — 19. Ikeda K., Hamguchi K., Migita S. — J. Biochem. (Tokyo), 1968, v. 63, p. 654. — 20. Jirgensons B. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 200, p. 9. — 21. Bear R. H., Roholt O. A., Bello J. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1974, v. 61, p. 1177—1179. — 22. Рачев Р. Р., Ещенко Н. Д. Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры. М., 1975, с. 15—25. — 23. Гаспарян Э. И., Антонян К. А. — Пробл. эндокринолог., 1976, № 4, с. 64—68. — 24. Николаев А. И. Аспекты общей аутоиммунпатологии. Ташкент, 1977, с. 6—49. — 25. Селиванова К. Ф., Глушкова О. В., Троицкий Г. В. и др. — В кн.: Патология крови, кровообращения и дыхания. Харьков, 1976, с. 12. — 26. Введение в иммуногенетику. Под ред. Р. С. Незлина. М., 1975, с. 158—169. — 27. Туракулов Я. Х. — В кн.: Новое о гормонах и механизме их действия. Киев, 1977, с. 65—80.

Поступила 29/XI 1977 г

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF IMMUNOGLOBULIN FROM BLOOD SERUM OF THYROIDECTOMIZED RABBITS

O. G. Kosik, G. V. Troitsky, V. G. Pavlyuk, K. D. Galakhin, M. K. Toskina

Chair of Biochemistry, Krimean Medical School, Simpheropol

Immunoglobulin from blood serum of thyroidectomized rabbits was distinct from the protein obtained from control animals in some physico-chemical and conformational properties, as shown by circular optic dichroism, spectropolarimetry (in visible and UV light) and isoelectric focusing. The differences are considered as an indication of appearance of unusual for the normal state, «pathological» proteins in the blood of experimental animals.

УДК 612.352.3:612.398.198

А. Б. Фицнер

ОБМЕН L-АЛЬБИЦИЦИНА В СРЕЗАХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Лаборатория энзимологии АМН СССР, Москва

При инкубации срезов печени крысы в фосфатном буфере с L-альбицицином (L-α-амино-β-урейдопропионовой кислотой) происходило образование УФ-поглощающего соединения, содержащего в своем составе рибозу. Показан ферментативный характер синтеза этого УФ-поглощающего соединения. Предложены и обсуждены два вероятных механизма образования последнего: 1) в результате собственного обмена L-альбицицина, 2) вследствие ингибирующего действия L-альбицицина на биосинтез пуринов de novo.

L-альбицин (L- α -амино- β -уреидопропионовая кислота) является природной аминокислотой, выделенной из семян некоторых видов акаций [1, 2]. Известно, что L-альбицин способен угнетать *in vitro* рост некоторых опухолевых тканей — клеток HeLa и астроцитомы мозга [3]. Будучи структурным аналогом L-глутамина и L-аспарагина, L-альбицин является ингибитором глутаминаз (КФ 3.1.5.2) и аспарагиназ (КФ 3.5.1.1) у различных организмов [4—9], а также формилглицинамидрибонуклеотидаминотрансферазы (КФ 6.3.5.3) из печени цыпленка, утилизирующей L-глутамин при биосинтезе пуринов [10]. Однако L-альбицин структурно сходен не только с амидами дикарбоновых аминокислот, но и с уреидоантарной (карбамиласпарагиновой) кислотой, являющейся непосредственным предшественником при биосинтезе пиримидинов. Предпосылкой к этому исследованию явилось наблюдение С. Р. Мардашева [11], который отмечал накопление неизвестного УФ-поглощающего соединения при инкубации L-альбицина.

Методика

В опытах использовали белых беспородных крыс массой 150—200 г, предварительно голодавших в течение 18—20 ч. Печень быстро замораживали с помощью сухого льда и готовили срезы толщиной 1—2 мм. В инкубационные колбочки помещали по 0,5 г срезов печени в 2,0 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 8,0) и добавляли раствор L-альбицина, приготовленный на том же буфере (5 мг в 0,5 мл, т. е. 2,0 мг/мл инкубационной пробы). В контрольные пробы добавляли 0,5 мл буфера без L-альбицина. Пробы инкубировали на водяной бане при 37°C в течение 1—3 ч на воздухе при перемешивании и реакцию останавливали, добавляя в каждую колбочку по 0,25 мл 57% HClO_4 (конечная концентрация $\sim 0,52$ М). Осадок белка отделяли фильтрованием или центрифугированием

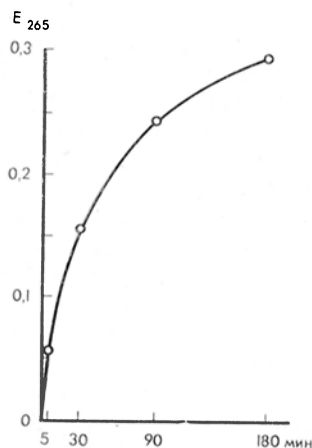


Рис. 1. Зависимость образования УФ-поглощающего соединения от времени инкубации L-альбицина.

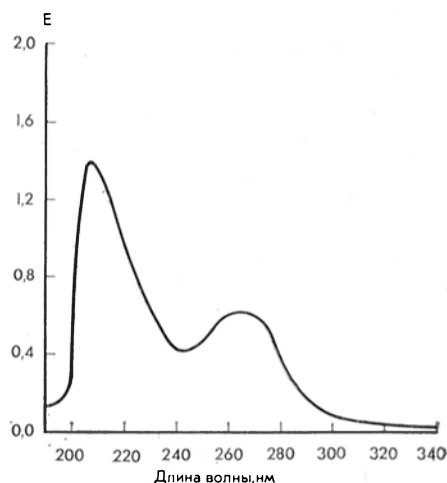


Рис. 2. Спектр УФ-поглощающего соединения в 0,1 н. HCl .

(10 мин при 3000 об/мин) и к надосадочной жидкости после ее охлаждения на ледяной бане добавляли несколько капель насыщенного раствора едкого кали (до слабокислой реакции по универсальному индикатору). 0,1—0,2 мл надосадочной нейтрализованной жидкости наносили на бумагу ватман № 1 и проводили нисходящее хроматографирование в смеси *n*-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода (4:1:1). Хроматограмму высушивали и просматривали под ультрафиолетом (при 254 нм), очерчивая УФ-поглощающие пятна карандашом. Пятна вырезали, измельчали, экстрагировали 0,1 н. HCl и их спектры регистрировали на спектрофотометре-4А в интервале 220—340 нм или на спектрофотометре-самописце «Uniscan SP. 800» (Англия) в интервале 190—340 нм. Объединенные солянокислые элюаты УФ-поглощающих пятен, соответствующие предполагаемому метаболиту L-альбицина ($R_f=0,4$), упаривали на ротационном испарителе под небольшим вакуумом до объема нескольких миллилитров; после охлаждения выпадали кристаллы. Для

обнаружения L-альбициина после его отделения от УФ-поглощающего соединения хроматограмму проявляли смесью 96° этанол (100 мл) — концентрированная HCl (10 мл) — п-диметиламинобензальдегид (1 г): желто-лимонное окрашивание после нагревания. Качественную реакцию на рибозу проводили с орциновым реактивом [12]. При выполнении данной работы были использованы следующие реактивы: L-альбицин фирмы «Koch-Light» (Англия), орцин фирмы «Merck» (США), остальные реактивы — отечественного производства марок х. ч. и ч. д. а.

Результаты и обсуждение

При инкубации L-альбициина (конечная концентрация 13,6 мМ) со срезами печени крысы в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 8,0) накапливалось соединение, интенсивно поглощающее в ультрафиолетовой зоне спектра (200—300 нм). Как видно

Спектральные свойства УФ-поглощающего соединения

| Величины отношения длин волн | | | |
|------------------------------|---------|---------|---------|
| 250/260 | 270/260 | 280/260 | 290/260 |
| 0,74 | 1,01 | 0,67 | 0,37 |

Примечание. Спектры снимали в 0,1 н. HCl; величины отношения длин волн приведены как средние из 20—25 независимых измерений.

из рис. 1, образование этого соединения возрастало с увеличением времени инкубации с 5 мин до 3 ч. Ориентировочные расчеты интенсивности синтеза УФ-поглощающего соединения срезами печени крысы показали, что она составляет 4—5 ед. опт. пл. при E_{265} на

500 мг ткани за 3 ч инкубации при 37°С. При спектрофотометрическом изучении УФ-поглощающего соединения, выделенного хроматографией на бумаге и очищенного от других УФ-поглощающих веществ и от исходного L-альбициина, установлено большое сходство его спектра со спектрами природных пуриновых и пиримидиновых компонентов нуклеиновых кислот. На рис. 2 приведен спектр УФ-поглощающего соединения в 0,1 н. HCl, который, как можно видеть, имеет два максимума поглощения (при 206—207 и 264—265 нм) и один минимум (при 242—243 нм). Спектральная характеристика этого соединения представлена в таблице.

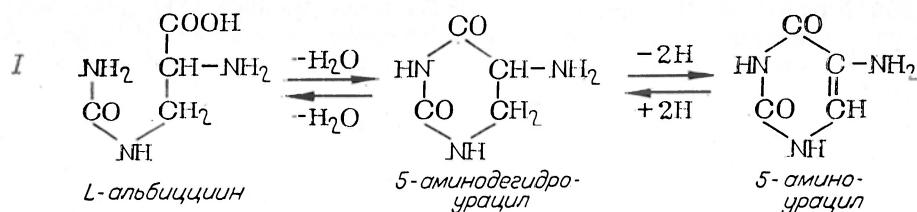
УФ-поглощающее соединение с таким спектром появлялось на хроматограмме только при инкубации интактных срезов печени крысы с L-альбицином. Не происходило накопления этого вещества в отсутствие L-альбициина, после предварительного прогревания срезов (3 мин на кипящей водяной бане) или при добавлении HClO_4 до инкубации срезов печени с L-альбицином. Это свидетельствует о ферментативном синтезе УФ-поглощающего соединения срезами печени крысы в условиях *in vitro*.

УФ-поглощающее соединение образовывалось при инкубации L-альбициина со срезами почки и мозга крысы, а также со срезами печени собаки или человека (посмертный материал после 1—2 ч хранения на льду) или с гомогенатом саркомы М-1.

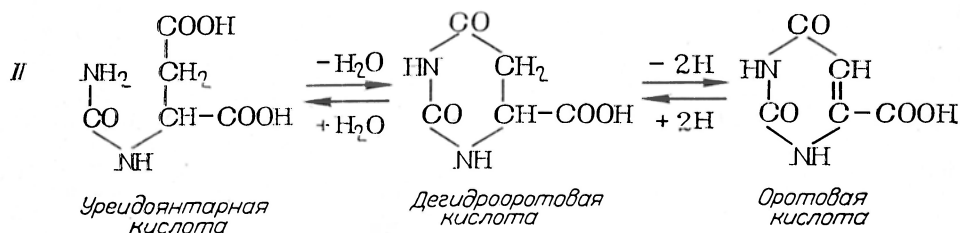
После обработки УФ-поглощающего соединения (5—10 ед. опт. пл. при E_{265}) орциновым реагентом наблюдали появление интенсивного изумрудно-зеленого окрашивания, что свидетельствует о наличии рибозы в составе этого вещества. Форма кристаллов УФ-поглощающего соединения, выделенного из объединенных инкубационных проб методом препаративной хроматографии на бумаге, видна на приводимой фотографии (рис. 3).

Принимая во внимание структурное сходство L-альбициина с уридо-янтарной кислотой, можно было бы предполагать возможность его метаболизма в последовательных реакциях замыкания кольца с образованием пиримидинового гетероцикла и окисления образовавшегося 5-аминодегидроурацила до 5-аминоурацила.

Именно на эту возможность подобного пути обмена L-альбициина указывал С. Р. Мардашев [11] (схема 1).



Для сравнения приведена схема II хорошо известного пути биосинтеза оротовой кислоты, как предшественника всех пиримидинов ДНК и РНК [13]



Однако выявленное нами наличие рибозы в составе УФ-поглощающего соединения указывает на рибозидный (или риботидный) его характер, что ставит под сомнение возможность подобного метаболизма L-альбициина (т. е. до 5-аминоурацила). Кроме того, по данным Стимсона [15], максимум поглощения 5-аминоурацила (при pH 3,0) находится при 260 нм, в то время как выделенное нами УФ-поглощающее соединение характеризовалось максимумом поглощения при 265 нм. Другим и более вероятным предположением, позволяющим объяснить накопление УФ-поглощающего соединения при инкубации L-альбициина со срезами печени крысы, может быть его ингибирующее действие на биосинтез пуринов de novo. Весьма вероятно, что L-альбициин, являясь

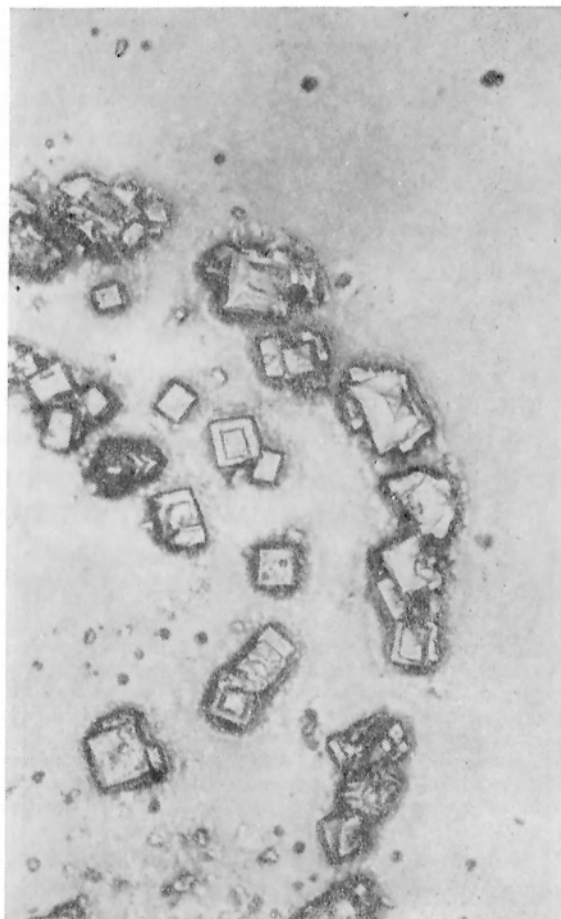


Рис. 3. Кристаллы УФ-поглощающего соединения. Ув. 70.

структурным аналогом L-глутамина, может блокировать утилизацию последнего и тормозить активность формилглицинамидрибонуклеотидами-

дотрансферазы на ранних стадиях биосинтеза пуринов [14]. Это согласуется с данными, ранее полученными Шредером в опытах по изучению влияния L-альбициина на активность этого фермента из печени цыпленка [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Gmelin R., Strauss G., Hasenmaier G. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1959, Bd 314, S. 28. — 2. Kjaer A., Larsen P. O., Gmelin R. — Experientia (Basel), 1959, v. 15, p. 253. — 3. Коваленко Н. А. — В кн.: Научная конференция медицинского факультета по проблеме злокачественного роста. 1-я. Материалы. М., 1969, с. 26. — 4. Соколов Н. Н., Николаев А. Я., Мардашев С. Р. — Микробиология, 1971, т. 40, с. 631. — 5. Мардашев С. Р., Коваленко Н. А. — Вopr. мед. химии, 1968, т. 14, с. 319. — 6. Абдумаликов А. Х., Еременко В. В. — Биохимия, 1967, т. 32, с. 363. — 7. Абдумаликов А. Х., Николаев А. Я. — Там же, с. 859. — 8. Мардашев С. Р., Соковнина Я. М. — Микробиология, 1965, т. 34, с. 47. — 9. Коваленко Н. А., Цветкова Т. А., Николаев А. Я. — Вopr. мед. химии, 1977, т. 23, с. 618. — 10. Schroeeder D. D., Allison A. J., Buchanan J. M. — J. biol. Chem., 1969, v. 244, p. 5856. — 11. Mar-dashev S. R. — Pure appl. Chem., 1963, v. 7, p. 689. — 12. Schneider W. C. — Meth. Enzymol., 1957, v. 3, p. 680. — 13. Кросби Дж. — В кн.: Нуклеиновые кислоты. Под ред. Э. Чаргаффа, Дж. Дэвидсона. М., 1962, с. 270. — 14. Бьюкенен Дж. — Там же, с. 254. — 15. Stimson M. M. — J. Am. Chem. Soc., 1949, v. 71, p. 1470.

Поступила 30/XI 1977 г.

ON THE METABOLISM OF L-ALBIZZIIN BY RAT LIVER SLICES

A. B. Fitzner

Laboratory of Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

During incubation of rat liver slices with L-albizziin (L- α -amino- β -ureidopropionic acid) formation of the UV-absorbing compound was observed. This compound was isolated from the incubating medium; it possessed two peaks of maximal absorption — at 206-207 nm and 264-265 nm, but a single minimal value at 242-243 nm. The presence of ribose as a constituent of the UV-absorbing compound was demonstrated. Two possible mechanisms explaining formation of the UV-absorbing compound were proposed: 1) metabolic conversion of L-albizziin, and 2) inhibition of purine biosynthesis de novo. The latter mechanism appears to be more probable.

УДК 615.272.4:547.586

Л. И. Поликарпова, С. Э. Резник, В. В. Рыженков, Г. Г. Хечинашвили,
Л. А. Петрова, Н. И. Мухина, О. А. Безрукова

ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВЕЩЕСТВ, СТРУКТУРНО БЛИЗКИХ ПЕНФЕНОНУ, У КРЫС И МЫШЕЙ

Лаборатория экспериментальной фармакотерапии отдела атеросклероза им. Н. Н. Аничкова Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Исследовано влияние веществ, структурно близких пенфенону (натриевой соли 2-фенил-3-метил-3-оксипентановой кислоты), на основные показатели липидного обмена в крови крыс и мышей и липопротеидные спектры сыворотки крови крыс. Все препараты оказывали гиполипидемическое действие, снижая концентрацию общего холестерина и триглицеридов в крови крыс. Этот эффект у мышей был менее выраженным. Наиболее отчетливым гиполипидемическим действием обладала натриевая соль 2-фенил-3,4-диметил-3-оксипентановой кислоты. Электрофоретическое разделение липопротеидов сыворотки крови в полиакриламидном геле выявило снижение β - и пре- β -липопротеидов, а также α -липопротеидов при действии этого препарата.

Известно, что развитие атеросклероза тесно связано с нарушением липидного обмена, приводящего к повышению концентрации холестерина и триглицеридов в плазме крови. Отложение липидов в артериальной стенке происходит вследствие проникновения в нее определенных классов липопротеидов (ЛП). Наиболее атерогенными являются ЛП низкой и очень низкой плотности (β - и пре- β -ЛП), осуществляющие транспорт основного ко-

личества холестерина и триглицеридов в организме [1]. В связи с этим актуальной задачей является изыскание эффективных гиполипидемических веществ, уменьшающих содержание холестерина и триглицеридов в плазме крови и приводящих к снижению количества атерогенных ЛП.

Ранее было показано, что производное дезоксимевалоновой кислоты — натриевая соль 2-фенил-3-метил-3-оксипентановой кислоты (пенфенон), синтезированное и изученное в отделе атеросклероза Института экспериментальной медицины АМН СССР, снижает концентрацию холестерина и триглицеридов в сыворотке крови и тормозит биосинтез холестерина и жирных кислот в печени разных видов животных [2—4]. Для выяснения связи химической структуры вещества с его гиполипидемическим действием был синтезирован ряд новых веществ, структурно близких пенфенону.

Содержание общего холестерина, холестерина α -ЛП, β -, пре- β -ЛП и триглицеридов (в мг%) в сыворотке крови крыс, получавших в течение 10 дней препараты I—V

| Препарат | Число опытов | Общий холестерин | P | Холестерин α -ЛП | P | β - и пре- β -ЛП | P | Триглицериды | Число опытов | P |
|----------|--------------|------------------|--------|-------------------------|--------|------------------------------|-------|--------------|--------------|--------|
| I | 7 | 74 \pm 3 | <0,001 | 60 \pm 2 | <0,001 | 133 \pm 13 | >0,1 | 50 \pm 6 | 10 | <0,05 |
| II | 8 | 74 \pm 6 | <0,01 | 58 \pm 4 | <0,001 | 116 \pm 8 | <0,01 | 34 \pm 4 | 10 | <0,001 |
| III | 8 | 75 \pm 3 | <0,001 | 61 \pm 3 | <0,01 | 134 \pm 9 | >0,1 | 46 \pm 5 | 10 | <0,01 |
| IV | 10 | 84 \pm 4 | <0,01 | 70 \pm 3 | >0,05 | 130 \pm 8 | >0,2 | 45 \pm 4 | 10 | <0,01 |
| V | 8 | 67 \pm 3 | <0,001 | 47 \pm 5 | <0,001 | 181 \pm 17 | >0,3 | 53 \pm 5 | 10 | <0,05 |
| Контроль | 11 | 101 \pm 3 | — | 82 \pm 5 | — | 161 \pm 13 | — | 70 \pm 5 | 8 | — |

В настоящей работе представлены результаты исследования гиполипидемического действия этих соединений в условиях *in vivo*. Испытывали пенфенон [1] и натриевые соли 3 кислот — 2-фенил-3,4-диметил-3-оксипентановой (II), 2,3-дифенил-3,5-диоксипентановой (III) и 2-фенил-3,4,4'-триметил-3-оксипентановой (IV) кислот. Для сравнительного изучения активности этих соединений использован известный зарубежный гиполипидемический препарат клофибрат (V).

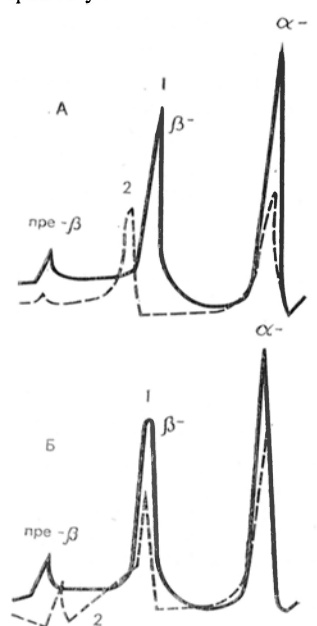
Методика

В работе использовали белых крыс-самцов массой 180—200 г и белых мышей-самцов массой 18—20 г. Острую токсичность препаратов определяли у мышей при внутрибрюшинном введении. LD₅₀ для препаратов I—V составляла соответственно 2100, 1150, 1000, 550 и 2000 мг/кг. Препараты вводили внутрибрюшинно 1 раз в день в течение 10 дней в дозах, равных 1/10 LD₅₀. Экспериментальную гиперлипидемию у части животных вызывали инъекцией тритона WR-1339 (22,5 мг на 100 г массы тела внутрибрюшинно). Исследуемые вещества в указанных дозах вводили дважды: за 24 ч до введения тритона и одновременно с ним за 18 ч до декапитации. Животных содержали на обычном рационе. За 18 ч до декапитации их лишали пищи. В каждый опыт брали сыворотку крови нескольких животных (2 крысы и 4—5 мышей). Липиды сыворотки крови экстрагировали по Брэндону [5]. Содержание общего холестерина в экстракте определяли по цветной реакции Либермана — Бурхарда, холестерина α -ЛП — [6], триглицеридов — [7], суммарной фракции пре- β и β -ЛП — [8]. Для анализа спектров ЛП сыворотки крови использовали метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле Волленвебера и Калке в модификации Маграчевой [9]. Электрофореграммы денситометрировали на автоматическом денситометре «Integrat Ch.» фирмы «Leitz» (Швейцария). Полученные данные обработаны методом вариационной статистики [10].

Результаты и обсуждение

Все исследуемые вещества снижали концентрацию холестерина в сыворотке крови крыс (табл. 1). Наиболее выраженный гипохолестеринемический эффект (на 26—27%) вызывали препараты II и III. Их влияние на содержание общего холестерина в сыворотке крови было таким же, как и

пенфенона, но несколько менее выраженным, чем клофибрата. В то же время у мышей не наблюдалось существенных изменений в содержании общего холестерина при введении пенфенона и веществ, структурно близких пенфенону.



Электрофорез липопротеинов сыворотки крови крыс. А — в норме (1) и после введения пенфенона (2); Б — в норме (1) и после введения препарата II (2).

ческий эффект оказывал препарат II, снижавший интенсивность фракций β- и α-ЛП (см. рисунок).

В табл. 2 представлены результаты изучения веществ, структурно близких пенфенону, на развитие тритоновой гиперлипидемии. Можно видеть, что введение тритона WR-1339 в 3 раза повышало содержание общего

Концентрация холестерина α-ЛП достоверно снижалась под влиянием препаратов II и III на 25—29 %, т. е. эти вещества оказывали такое же влияние на содержание холестерина α-ЛП, как и пенфенон. Таким образом снижение общего холестерина в сыворотке крови крыс под влиянием изученных соединений происходит в основном за счет холестерина α-ЛП. Этого следовало ожидать, так как α-ЛП содержат холестерин в наибольшем количестве у этого вида животных. Все вещества снижали содержание триглицеридов в сыворотке крови крыс. Сравнивая влияние этих препаратов с действием пенфенона и клофибрата, можно отметить, что их ингибирующий эффект является более выраженным (на 34—51 %), чем пенфенона (на 29 %) и клофибрата (на 24 %). У мышей наблюдались достоверное снижение содержания триглицеридов в сыворотке крови под влиянием препаратов III и IV и тенденции к снижению после введения препарата II. Содержание β- и пре-β-ЛП в сыворотке крови уменьшалось (на 28 %) в результате введения препарата II. Остальные исследованные вещества, а также пенфенон не вызывали при этом достоверных изменений. Данные анализа электрофореграмм спектров ЛП сыворотки крови крыс подтвердили, что наиболее выраженный гиполипидеми-

Т а б л и ц а 2
Влияние препаратов I—IV на содержание общего холестерина и триглицеридов (в мг%) в сыворотке крови крыс при тритоновой гиперлипидемии

| Условия опыта | Число опытов | Общий холестерин | P | Триглицериды | P |
|-----------------------|--------------|------------------|-------|--------------|--------|
| Тритон | 8 | 314±10 | — | 548±30 | — |
| Тритон + препарат I | 8 | 232±16 | <0,01 | 349±30 | <0,001 |
| Тритон + препарат II | 7 | 238±21 | <0,01 | 292±25 | <0,001 |
| Тритон + препарат III | 8 | 242±27 | <0,05 | 369±43 | <0,01 |
| Тритон + препарат IV | 8 | 245±26 | <0,05 | 386±46 | <0,05 |
| Контроль | 4 | 100±5 | — | 61±11 | — |

холестерина в сыворотке крови, концентрация триглицеридов при этом возрастала в 5—6 раз. Все испытанные препараты задерживали развитие тритоновой гиперлипидемии. Следует, однако, заметить, что вещества,

структурно близкие пенфенону, такие, как и пенфенон, не снижали содержания общего холестерина и триглицеридов до контрольного уровня. По-видимому, это объясняется тем, что изученные соединения влияют на процессы биосинтеза холестерина и триглицеридов, но не на их обмен в крови и выведение из кровяного русла. Возможно также, что исследованные вещества уменьшали липолитическое действие тритона WR-1339.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что все изученные нами соединения, структурно близкие пенфенону, оказывают отчетливое гиполипидемическое действие, более выраженное у крыс, чем у мышей. Следует также отметить, что из этой группы исследованных веществ препарат II был наиболее эффективным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. Н. — В кн.: Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М., 1977, с. 57—80. — 2. Климов А. Н., Климова Т. А., Магграчева Е. Я. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1974, № 1, с. 59—64. — 3. Климов А. Н., Климова Т. А., Полякова Э. Д. и др. — Там же, 1974, № 1, с. 65—69. — 4. Полякова Э. Д., Выженков В. Е., Петрова Л. А. и др. *Пат. физиол.*, 1978, № 4, с. 50. — 5. Bragdon G. H. — In: *Lipids and the Steroid Hormones in Clinical Medicine*. Philadelphia 1960, p. 6. — 6. Климов А. Н., Ганелина И. Е. Фенотипирование гиперлиппротеидемий (метод. рекомендации). М., 1975, с. 31—32. — 7. Negi B. P., Frings C. S. — *Clin. Chem.*, 1973, v. 19, p. 1201—1202. — 8. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Баньковская Э. Б. — *Лабор. дело*, 1966, № 5, с. 276—280. — 9. Магграчева Е. Я. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 6, с. 652—655. — 10. Белецкий М. Л. *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*. Л., 1963.

Поступила 9/XII 1977 г.

HYPOLIPIDEMIC ACTIVITY OF SUBSTANCES, STRUCTURALLY RESEMBLING PENPHENONE, IN RATS AND MICE

L. I. Polikarpova, S. E. Reznik, V. E. Ryzhnikov, G. G. Khechinashvili, L. A. Petrova, N. I. Mukhina, O. A. Bezrukova

N. N. Anichkov Laboratory of Experimental Pharmacotherapeutics, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Effect of substances, structurally related to penphenone (2-phenyl-3-methyl-3-hydroxypentanoic acid sodium salt), was studied on the main patterns of lipid metabolism in blood of rats and mice, as well as on lipoprotein spectra of rat blood serum. All the compounds studied exhibited hypolipidemic effect, decreasing concentration of total cholesterol, cholesterol of α -lipoproteins and triglycerides in rat blood. The effect was less distinct in mice. 2-phenyl-3,4-dimethyl-3-hydroxypentanoic acid sodium salt possessed the most pronounced hypolipidemic effect. A decrease in content of β - and pre- β -lipoproteins as well as of α -lipoproteins was observed after electrophoretic separation of blood serum lipoproteins in polyacrylamide gel in animals treated with the compound.

УДК 615.214.22:547.891.2]033

Н. Я. Головенко, Т. Л. Карасева, А. А. Курушин

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ 7-АМИНОПРОИЗВОДНОГО НИТРАЗЕПАМА СУБКЛЕТОЧНЫМИ ФРАКЦИЯМИ НЕКОТОРЫХ ОРГАНОВ И КРОВЬЮ БЕЛЫХ КРЫС

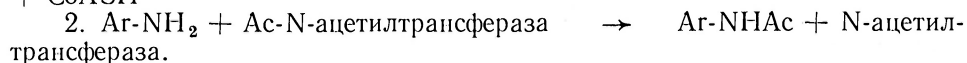
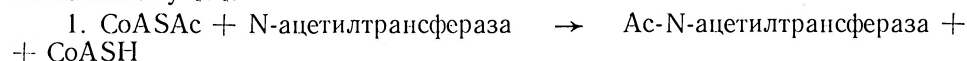
Лаборатория психотропных препаратов Одесского университета им. И. И. Мечникова

Сочетанием методов тонкослойной и колоночной хроматографии, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии изучена способность митохондрий и растворимой фракции печени, легких и почек, а также форменных элементов крови белых крыс ацетилировать *in vitro* 7-аминопроизводное нитразепама. Введение в инкубационную среду, содержащую субклеточные фракции исследуемых органов животных, эквимольных субстрату концентраций ацетилкоэнзима А ингибирует процесс ацетилирования в митохондриях и активизирует в растворимой фракции. Ацетилирующая активность по отношению к субстрату у лейкоцитов в 1000 раз выше, чем у эритроцитов. В прокипяченных субклеточных фракциях, диализованной плазме крови и растворе Рингера субстрат в присут-

отвии ацетилкоэнзима А не ацетируется. На основании проведенного исследования показана возможность ряда органов и тканей экспериментальных животных ферментативным путем ацетилировать аминокислотное производное нитразепама.

Процессы ацетилирования широко представлены в природе, и некоторые соединения, имеющие гидроксильные или тиоловые группы, могут быть субстратами, на которые действуют ферменты, катализирующие присоединение ацетильной группы. Для таких чужеродных веществ, как ароматические амины, α -аминокислоты, гидразины и сульфонамиды ацетилирование — основной путь их превращения в организме животных и человека [1]. Все перечисленные органические соединения участвуют в реакциях биосинтеза благодаря наличию в их молекуле аминогруппы. Однако алифатические и фенилзамещенные алифатические амины не ацетируются, хотя гистамин в незначительной степени может ферментативно трансформироваться в N^2 -ацетилгистамин [2].

Реакции ацетилирования чужеродных для организма веществ катализируются N -ацетилтрансферазами по так называемому упорядоченному Биби-механизму [3].



Ацетилирование обычно считается функцией печени. Тем не менее этот процесс характерен для клеток легких и селезенки [4], а также желудочно-кишечного тракта [5, 6].

Исследуемый нами гетероциклический амин (7-амино-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенз diaзепин-2-он) — основной метаболит нитразепама, образуется в организме животных и человека в результате ферментативного восстановления аминогруппы. В предыдущих исследованиях [7] было показано, что нитроредуктазы, N -ацетилтрансферазы и деацетилазы, метаболизирующие соответствующие 1,4-бенз diaзепины, образуют в печени экспериментальных животных мультиэнзимный комплекс, имеющий видовые различия. Отмечалось также, что субстрат восстанавливается в растворимой и микросомальной фракциях печени и легких [8, 9], а также ферментами энтероцитов и микрофлорой пищеварительного тракта [10].

Целью настоящей работы является сравнительное изучение ацетилирования 7-аминопроизводного нитразепама субклеточными фракциями печени, легких и почек, а также кровью и ее форменными элементами у белых крыс.

Методика

Аминоппроизводное нитразепама и его ацетильный аналог синтезированы в нашей лаборатории. Индивидуальность и строение соединений подтверждены данными элементного анализа. УФ-, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Опыты проводили на крысах-самцах массой 180—220 г. Митохондрии выделяли из печени, почек и легких методом дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 0,25 М сахарозу и 50 мМ трис-НСl-буфер pH 7,4. Постмитохондриальную жидкость центрифугировали 60 мин при 105 000 g для получения микросом и растворимой фракции. Все процедуры по выделению субклеточных структур проводили на холоду в центрифугах ЦЛР-1 и ВАР-601.

Лейкоциты из крови получали путем быстрого осаждения эритроцитов [11]. Физиологическое состояние лейкоцитов определяли по их фагоцитарной реакции. Промытые лейкоциты и эритроциты растворяли в 3 мл физиологического раствора. Плазма крови в этой серии опытов использовалась в таком же объеме. Для подсчета лейкоцитов и эритроцитов в соответствующих взвесах применяли общепринятые методики подсчета форменных элементов крови в камере Горяева.

Инкубационная среда для субклеточных фракций имела следующий состав: 100 мкмоль субстрата, 50 ммоль трис-НСl pH 7,4, MgCl_2 и K_2SO_4 — по 15 ммоль. В одной серии опытов в среду добавляли 25 мкмоль CoASAc . Количество белка в пробах определяли по Лоури [12]. Инкубацию проводили при 37°C в течение 60 мин. В 4 мл цельной крови, плазмы, лейкоцитарной и эритроцитарной взвеси также находилось 100 мкмоль субстрата. Инкубацию осуществляли в стерильных закрытых сосудах в течение 6 ч при 37°C.

После инкубации внесенное вещество и продукт его превращения экстрагировали хлороформом [7, 13]. Объединенные хлороформные экстракты упаривали в концентраторах досуха. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл хлороформа и при помощи стеклянного капилляра наносили на хроматографические пластинки с закрепленным слоем силикагеля «Силуфол УВ-254» или пипеткой на колонку, заполненную силикагелем КСК-1 [14]. Лучшая система растворителей при тонкослойной хроматографии исследуемых веществ — толуол — ацетон — аммиак (25:25:0,1). Хроматографическое разделение соединений на колонке достигали изменением полярности растворителей.

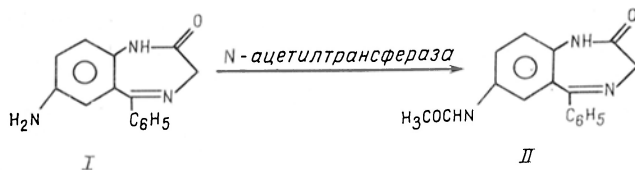
Для идентификации веществ на хроматографическую пластинку наносились предполагаемые метаболиты, синтезированные в нашей лаборатории. После хроматографического разделения пластинки высушивали и помещали в камеру с парами HCl на 1 мин, а затем исследовали в УФ-свете (253,7 нм). Метаболиты идентифицировали по величине R_f . Кроме того, элюированные метаболиты исследовали методами УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. УФ-спектры веществ были сняты в этаноле на спектрофотометре «Срескод UV Vis», в масс-спектры — на MX-1303 [15]. Для количественного определения образовавшегося метаболита соответствующие пятна на хроматограмме растворяли в 4 мл этанола и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-16 при 248 нм. Параллельно проводили контрольные исследования с биологическими жидкостями, в которых субстрат ацетилирования отсутствовал. Количество соединения определяли по калибровочным графикам с введением поправок на их извлекаемость из биологических проб. Полученные данные обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Ацетилирование гетероциклического амина субклеточными фракциями печени, почек и легких белых крыс. Через 60 мин после внесения субстрата (γ -амино-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он) в инкубационную среду, содержащую митохондрии, микросомы и растворимую фракцию исследуемых органов, на хроматографических пластинках было обнаружено два соединения, имеющих различные значения R_f . Методом колоночной хроматографии хлороформные экстракты были разделены на две фракции (рис. 1), которые содержали вещества со значениями R_f при тонкослойной хроматографии 0,38 и 0,28. В УФ-спектре соединения I наблюдались две полосы поглощения (220 и 240 нм), а соединения II — три (230, 248 и 320 нм, которые практически не отличались от аналогичных спектров синтезированных веществ.

В масс-спектре соединения I наблюдается пик молекулярного иона с m/e 251 (100)* и пики фрагментных ионов с m/e 252 (11), 250 (21), 223 (49), 222 (50), 69 (5,0). Для вещества II отмечен пик молекулярного иона с m/e 294 (100) и пики фрагментных ионов с m/e 292 (30), 266 (50), 265 (62), 264 (30), 223 (8), 222 (12), 69 (8).

На основании сравнения величин R_f обнаруженных метаболитов с аналогичными свойствами синтезированных соединений, их окраски при облучении хроматограмм УФ-светом, а также данных колоночной хроматографии, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии исследуемые вещества были идентифицированы нами как исходный субстрат (I) и его ацетильное производное (II).



Результаты количественного определения образовавшегося из субстрата ацетильного производного представлены в табл. 1.

Митохондрии исследуемых органов, инкубируемые в среде без ацетил-козима А, практически в равной степени ацетируют амин. Для растворимой фракции печени крыс в этой серии опытов наиболее ярко выражена

* В скобках приведены интенсивности пиков в процентах от пика с максимальной интенсивностью.

активность N-ацетилтрансферазы, которая стимулируется внесением в среду донора ацетильной группы. Микросомы печени, почек и легких незначительно трансформируют соединение I, что, по-видимому, обусловлено частичным загрязнением митохондриями.

Ацелирование аминопроизводного нитразепама кровью белых крыс. В связи с тем что клетки крови экспериментальных животных и человека содержат ферменты, катализирующие такие основные реакции метаболизма

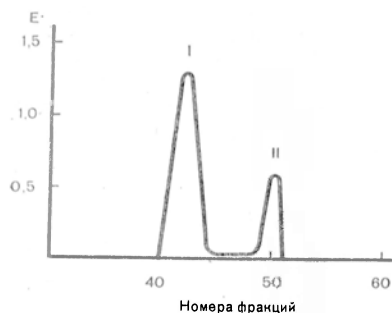


Рис. 1. Хроматография на силикагеле КСК-1 (76 меш) хлороформных экстрактов биологических жидкостей, содержащих 7-амино-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он (I) и его ацетильное производное (II).

Колонку (10×0,5 см) уравнивали гексаном, скорость элюирования 1 мл за 3 мин, объем фракций 1 мл. 1—10 фракции — гексан; 11—20 — четыреххлористый углерод; 21—30 — хлороформ — четыреххлористый углерод (4 : 1); 31—40 — гексан — ацетон (4 : 1); 41—60 — хлороформ — ацетон (4 : 1). I — E₂₄₀; II —

ма ксенобиотиков, как ароматическое гидроксирование [16], гидролиз [17] и синтез [18], нами изучена возможность ацелировать ими исследуемый субстрат. Обычно при внутривенном введении крысам нитразепама максимальное содержание исходного соединения и его метаболитов наблюдается через 15 мин [17]. В этот период исследования распределение нитразепама и ацетильного производного в плазме крови и ее форменных элементов носит неравномерный характер (табл. 2). Наиболее высокая концентрация нитразепама отмечена в плазме крови и эритроцитах. Аминопроизводное практически равномерно распределяется в плазме крови и ее форменных элементах. В то же время лейкоциты и плазма крови содержат больше ацетильного производного, чем эритроциты. В организме белых крыс нитразепам восстанавливается нитроредуктазами различных органов и тканей до аминопроизводного. В связи с этим не только исходное соеди-

нение, но и его амин всасывается и поступает в кровь. Часть амина вовлекается во внутрипеченочную циркуляцию [19] с последующим ацелированием в печени и пищеварительном тракте [10]. Другая часть претерпевает такое превращение непосредственно в крови. Об этом свидетельствуют опыты *in vitro* (рис. 2). Наибольшее количество ацетильного производного образуется из амина в инкубационной среде, содержащей лейкоцитарную взвесь, несколько меньшее — во взвеси эритроцитов и еще меньшее — в плазме крови.

Представленные данные указывают на способность ферментных систем митохондрий и растворимой фракции печени, почек и легких, а также крови белых крыс ацелировать 7-аминопроизводное нитразепама. Это свидетельствует, что в дезинтоксикации чужеродных соединений посредством биосинтеза участвуют различные органы и ткани экспериментальных животных. Учитывая преимущественную локализацию переносчика ацетильных групп в митохондриях, можно понять, почему в их присутствии без внесения извне ацетилкоэнзима А наблюдается наиболее высокое превращение амина в ацетильное производное (см. табл. 1). Внесение в инкубационную среду кофермента частично ингибирует этот процесс, что связано, по-видимому, с высокими концентрациями его свободной формы [20].

В отличие от митохондрий добавление ацетилкоэнзима А растворимой фракции приводит к резкому увеличению активности N-ацетилтрансферазы всех исследуемых органов. Можно предположить, что в этой фракции содержится значительное количество N-ацетилтрансферазы, но отсутствие донора ацетильных групп препятствует течению реакции. В этой серии опытов растворимая фракция печени оказалась наиболее активной по сравнению с почками и легкими. Однако следует отметить, что активность N-ацетил-

трансферазы различных органов и тканей животного зависит не только от их структурной организации, но и обусловлена физико-химическими свойствами субстратов. Так, сульфадiazин ацетируется в почках, а активность N-ацетилтрансферазы печени при использовании в качестве субстрата сульфаметазина в 20—15 раз выше, чем в других органах [21]. Если для такого рода исследований используется 2,4-толуолдиамин, то эта разница уменьшается в 8 раз [22].

Т а б л и ц а 1

Количество ацетильного производного в инкубационной среде, содержащей субклеточные фракции клеток печени, почек и легких ($n=6-8$)

| Органы | Субклеточные фракции | Количество вещества, мкмоль на 1 мг белка за 1 ч | |
|--------|----------------------|--|---------------------|
| | | без ацетилко-энзима А | с ацетилкоэнзимом А |
| Печень | Митохондрии | $0,60 \pm 0,05$ | $0,60 \pm 0,11$ |
| | Микросомы | $0,09 \pm 0,02$ | $0,04 \pm 0,01$ |
| | Растворимая фракция | $0,10 \pm 0,04$ | $1,36 \pm 0,20$ |
| | Митохондрии | $0,54 \pm 0,07$ | $0,33 \pm 0,13$ |
| Почки | Микросомы | $0,04 \pm 0,007$ | $0,03 \pm 0,009$ |
| | Растворимая фракция | $0,06 \pm 0,02$ | $0,99 \pm 0,07$ |
| | Митохондрии | $0,50 \pm 0,035$ | $0,25 \pm 0,10$ |
| Легкие | Микросомы | $0,095 \pm 0,012$ | $0,07 \pm 0,01$ |
| | Растворимая фракция | $0,07 \pm 0,01$ | $1,06 \pm 0,27$ |

П р и м е ч а н и е. Общий объем инкубационной среды составлял 3 мл и содержал 100 мкмоль субстрата. Количество обнаруженного продукта реакции в различных опытах составляло 1,07—32,5 мкг на пробу.

Видовые различия активности N-ацетилтрансферазы идентичны для большинства используемых субстратов. Растворимая фракция печени хомяка обладает самой высокой активностью, у морских свинок, мышей и крыс она снижается. В цитозоле печени собак активность N-ацетилтрансферазы отсутствует [23].

По сравнению с субклеточными фракциями исследуемых органов ацетилирующая активность крови значительно ниже (см. табл. 1 и рис. 2). Если ферментативную активность форменных элементов рассчитывать на их общее количество, которое было выделено из определенного объема крови, то она не отличается у эритроцитов и лейкоцитов (см. рис. 2). Если расчеты проведены на определенное количество клеток (10^9), то в этом случае за 6 ч в эритроцитах образуется $1,03 \pm 0,4$ нмоль, а в лейкоцитах — $1004 \pm 81,1$ нмоль ацетильного производного. Следовательно, лейкоциты осуществляют ацетилирование исследуемого субстрата в 1000 раз активнее, чем эритроциты. Тем не менее эритроциты играют значительную роль в процессе ацетилирования субстратов благодаря их высокому содержанию в крови.

Способность форменных элементов ацетилировать амины также зависит от химической структуры последних. Лейкоциты содержат ферменты, катализирующие присоединение ацетильной группы к сульфаметазину и п-

Т а б л и ц а 2

Содержание нитразепама и его метаболитов в эритроцитах, лейкоцитах и плазме крови (из 1 мл крови) белых крыс при внутрибрюшинном введении исходного вещества в дозе 10 мг/кг ($n=7$)

| Вещество | Количество вещества, мкг | | |
|------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| | в эритро-цитах | в лейко-цитах | в плазме крови |
| Нитразепам | $4,48 \pm 0,45$ | $2,13 \pm 0,17$ | $4,72 \pm 0,67$ |
| Аминопроизводное | $2,37 \pm 0,04$ | $2,22 \pm 0,16$ | $2,34 \pm 0,13$ |
| Ацетильное производное | $0,91 \pm 0,04$ | $1,71 \pm 0,12$ | $1,52 \pm 0,31$ |

аминосалициловой кислоте [24], но неэффективны к прокаинамиду и п-аминобензойной кислоте [25]. Эритроциты ацетируют п-аминобензойную и п-аминосалициловую кислоты и не ацетируют изониазид [26].

В последнее время установлено, что ацелирование некоторых ксенобиотиков может осуществляться неферментативным путем. В частности, гидралазин неферментативно ацелируется в растворе Рингера или диализированной плазме крови в присутствии ацетилкоэнзима А. Однако такое

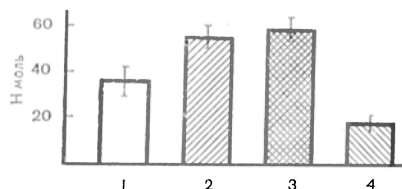


Рис. 2. Количество ацетильного производного (H) в инкубационной среде, содержащей субстрат и 3 мл цельной крови (1), эритроциты (2), лейкоциты (3) и плазму крови (4), выделенные из 5 мл крови ($n=7$).

Общий объем инкубационной среды составлял 4 мл и содержал 100 мкмоль субстрата.

превращение не вносит значительного изменения в перераспределение соединений в организме экспериментальных животных. Это происходит потому, что через 18 ч инкубации гидралазина в лейкоцитарной взвеси обнаруживаются лишь следовые количества 3-метил-3-триазоло(3,4)-фалазина, тогда как период полураспада исходного соединения в плазме составляет от 2 до 8 ч [27]. Спонтанно ацелируются N-окси-2-ацетил-аминофлуорен [28] и гистоны тимуса [29].

Используя методы, которыми изучается неферментативное превращение ряда субстратов [26], в форменных

элементах крови и ее плазме, а также прокипяченные субклеточные фракции [27], мы не обнаружили даже следовых количеств ацетильного производного. Полученные результаты свидетельствуют, что ацелирование исследуемого амина во всех случаях носит ферментативный характер.

Ацелирование аминосоединений в организме людей является полиморфным процессом. Полиморфизм наблюдается и в скорости ацелирования изониазида у кроликов [2]. Наши исследования не показали значительных индивидуальных различий в ацелировании исследуемого субстрата, что указывает на его мономорфное превращение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adamson R. H., Davies D. S. — *Comp. Pharmacol.*, 1973, v. 11, p. 851.
2. Парк Д. В. Биохимия чужеродных соединений. М., 1973.
3. Steinberg M. S., Cohen S. N., Weber W. W. — *Biochim. biophys. Acta*, 1971, v. 235, p. 89.
4. Govier W. C. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1965, v. 150, p. 305.
5. Hartiala K. — *Physiol. Rev.*, 1973, v. 53, p. 496.
6. Головенко Н. Я. — *Успехи совр. биол.*, 1977, т. 83, № 3 (6), с. 429.
7. Головенко Н. Я., Богатский А. В., Карасева Т. Л. — *Докл. АН УССР. Сер. Б*, 1976, № 5, с. 446.
8. Богатский А. В., Андронати С. А., Карасева Т. Л. и др. — В кн.: Биохимия митохондрий. М., 1976, с. 34.
9. Богатский А. В., Головенко Н. Я., Карасева Т. Л. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 1, с. 92.
10. Головенко Н. Я., Богатский А. В., Орлюк Е. А. и др. — *Бюлл. exper. биол.*, 1977, № 7, с. 53.
11. Кост Е. А. (ред.) *Справочник по клиническим лабораторным методам исследования*. М., 1975.
12. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265.
13. Богатский А. В., Головенко Н. Я., Андронати С. А. и др. — В кн.: Физиологически активные вещества. Киев, 1975, вып. 7, с. 79.
14. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Карасева Т. Л. и др. — *Фармация*, 1977, № 4, с. 42.
15. Богатский А. В., Андронати С. А., Старовойт И. А. и др. — В кн.: *Новости полярографии*. Рига, 1975, с. 165.
16. Kellermann G., Shaw C. R., Luyten-Kellermann M. — *New Engl. J. Med.*, 1973, v. 289, p. 934.
17. Denny G. H., Hagerman D. D. — *Science*, 1956, v. 123, p. 987.
18. Mannl H. F., Hempel K., Hubler W. — *Naynun-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1972, Bd 272, S. 265.
19. Головенко Н. Я., Карасева Т. Л. — *Фармакол. и токсикол.*, 1978, № 1, с. 17.
20. Асатнани В. С. Ферментативные методы анализа. М., 1969.
21. Weber W. W., Cohen S. N. — *Molec. Pharmacol.*, 1967, v. 3, p. 266.
22. Glinsukon T., Benjamin T., Grantham P. et al. — *Xenobiotica*, 1975, v. 5, p. 475.
23. Lower G. M., Bryan C. T. — *Biochem. Pharmacol.*, 1973, v. 22, p. 1581.
24. Harse D. V.,

Weber W. W. — Biochem. J., 1973, v. 132, p. 519. — 25. Drayer D. E., Strong J. M., Jones B. et al. — Drug. Metab. Dispos., 1974, v. 2, p. 499. — 26. Motulsky A. G., Steinmann L. — J. clin. Invest., 1962, v. 41, p. 1387. — 27. Reidenberg M. M., Drayer D., Demarco A. Z. et al. — Clin. Pharmacol. Ther., 1973, v. 14, p. 970. — 28. Lotikar P. D., Luna L. — Molec. Pharmacol., 1971, v. 7, p. 381. — 29. Paik W. K., Pearson D., Loch H. W. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 213, p. 513.

Поступила 16/XII 1977 г.

ACETYLATION OF 7-AMINODERIVATIVE OF NITRAZEPAME BY SUBCELLULAR FRACTIONS OF SOME TISSUES AND BLOOD OF RATS

N. Ya. Golovenko, T. P. Karaseva, A. A. Kurushin

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

Enzymes from mitochondria and soluble fraction of lungs, kidney and liver tissues as well as from blood cells were shown to acetylate 7-aminoderivative of nitrazepam (7-amino-5-phenyl-1,2-dihydro-3-N-1,4-benzodiazepine-2-on). The investigation was carried out using thin-layer and column chromatography, UV-spectroscopy and mass spectrometry. Acetylation of the substrate was inhibited in mitochondria but in soluble fraction the reaction was activated by equimolar concentrations of coenzyme A. The acetylating activity towards substrate was 1,000-fold higher in leukocytes than in erythrocytes.

УДК 617.764.1-008.831-074

Н. Е. Хурсин

ОБНАРУЖЕНИЕ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ДНК-АЗ В СЕКРЕТЕ СЛЕЗНЫХ ЖЕЛЕЗ ЧЕЛОВЕКА

Институт проблем онкологии АН УССР, Киев

Методом горизонтальной вискозиметрии обнаружено наличие ДНК-аз в секрете слезных желез человека. Обсуждается их возможная защитная функция, направленная против чужеродных нуклеиновых кислот.

Основная функция ДНК-аз заключается в деполимеризации ДНК. Кроме репликации, ДНК-азы участвуют в транскрипции, процессинге ДНК, рекомбинации, репарации и т. д. [1].

В связи с тем что антитела на чистую, нативную, двуспиральную ДНК не образуются или образуются слабо [2], ДНК-азы, деполимеризуя чужеродную ДНК или собственную в распадающихся клетках, выполняют защитную функцию [3].

Из этого перечня функций ДНК-аз становится объяснимой их широкая распространенность. Они обнаруживаются почти во всех клетках и тканях человека, животных и растений. Однако в секрете слезных желез человека ДНК-азы до настоящего времени обнаружены не были. Вероятно, это связано с тем, что большинство исследователей для их обнаружения используют малочувствительные методы. Кроме этого, ДНК-аз в секрете слезных желез действительно мало, как будет показано ниже.

Методика

Для обнаружения ДНК-аз в секрете слезных желез человека мы избрали метод горизонтальной вискозиметрии как наиболее высокочувствительный, позволяющий обнаруживать единичные атаки ферментов даже в тех случаях, когда молекулярный вес ДНК не изменяется и ее молекулы физически остаются неразделимыми при полном отсутствии кислоторастворимых фрагментов.

ДНК, используемую в качестве субстрата, получали из эритроцитов птиц солевым методом, так как фенолы содержат ингибиторы ДНК-аз, мешающие их определению. На пробу брали 0,5 мл 0,2% раствора ДНК, добавляли 0,5 мл соответствующего буфера (фосфатного pH 7,4 или ацетатного pH 5,6) и 0,5 мл неразведенного секрета слезных желез. В инкубационную смесь добавляли также толуол и магний (для определения ДНК-аз в щелочной среде) [5]. Полученную смесь инкубировали при 43°C в течение 3 мин (контроль) и 16 ч.

Секрет слезных желез собирали в стерильные пробирки, используя для этого летучие вещества репчатого лука.

Капилляр горизонтального вискозиметра длиной 13 см вмещал 0,08 мл. На исследуемую смесь подавали давление 6 см вод. ст. Вязкость смеси определялась при температуре 37°C, которую поддерживали автоматически при помощи ультратермостата.

В настоящей работе представлены результаты четырех серий экспериментов. Каждая серия включает 22 определения активности ДНК-аз и состоит из 11 контрольных и 11 опытных проб.

Результаты и обсуждение

Полученные данные представлены на рис. 1 и 2. На рис. 1 отражена активность так называемых щелочных ДНК-аз. Как видно на рис. 1, спонтанный распад ДНК в наших условиях опытов был незначительным.

При добавлении в пробы 0,5 мл неразведенного секрета слезных желез картина резко меняется. Исходный уровень удельной вязкости, определяемый непосредственно после смешивания проб, оказывается выше, чем в

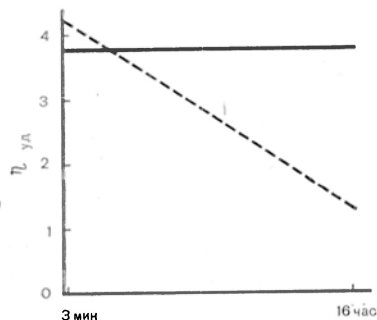


Рис. 1. Активность ДНК-аз секрета слезных желез человека в щелочной среде (pH 7,4).

Здесь и на рис. 2: сплошная линия — контроль (без секрета); пунктирная — при наличии секрета.

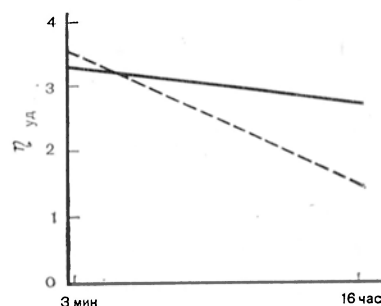


Рис. 2. Активность ДНК-аз секрета слезных желез человека в кислой среде (pH 5,6).

контроле, почти на 11 %. Это увеличение мы объясняем образованием комплекса между ДНК и ДНК-азами, что подтверждается данными литературы [4]. Наблюдается также резкое (на 69 %) снижение удельной вязкости субстрата через 16 ч инкубации.

Сходные данные получены при изучении активности ДНК-аз секрета слезных желез человека в кислой среде (pH 5,6) (см. рис. 2). В этом случае удельная вязкость непосредственно после добавления 0,5 мл секрета слезных желез человека незначительно (на 6 %) повысилась, а через 16 ч инкубации снизилась на 57 %.

Учитывая механизм действия ДНК-аз [5], мы можем с уверенностью сказать, что наблюдаемое снижение удельной вязкости субстрата может быть обусловлено только влиянием ДНК-аз. Следовательно, секрет слезных желез человека содержит наряду с лизоцимом и ДНК-азы, выполняющие, вероятно, в данном случае, как и лизоцим, защитные функции.

Поскольку ДНК-азы в секрете слезных желез человека обнаружены нами впервые, представляло несомненный интерес определить их абсолютное содержание. Из литературы известно [6], что эта величина может быть установлена путем сравнения с действием известных количеств ДНК-аз, вызывающих аналогичное снижение удельной вязкости. Мы имеем опыт работы с ДНК-азами сыворотки крови человека, которые вызывают аналогичное снижение удельной вязкости ДНК при разведении в 6—7 раз.

Если учесть, что в сыворотке крови человека содержится $6 \cdot 10^{-8}$ г/мл ДНК-аз [5, 6], а вес одной молекулы при молекулярном весе 35 000 [5, 7] равен $5,81 \cdot 10^{-20}$ г, то в 1 мл сыворотки крови человека содержится $1,033 \times 10^{12}$ молекул ДНК-аз, а в 1 мл секрета слезных желез — в 6—7 раз меньше, т. е. $1,43—1,72 \cdot 10^{11}$ молекул или $1—0,86 \cdot 10^{-8}$ г/мл.

Известно, что железы, выделяя свой секрет, отторгают вместе с ним и часть своей собственной протоплазмы, поэтому можно допустить, что в секрет слезных желез попадает часть ДНК-аз лизосом клетки, ее митохондрий и клеточного сока.

Слизистая и роговая оболочки глаз постоянно находятся в контакте с окружающей внешней средой, и различные виды микроорганизмов и вирусов, несомненно, попадают на их поверхность. Лизоцим ориентирован главным образом на белки, тогда как нуклеазы, деполимеризуя нуклеиновые кислоты, могут лишать их инфекционности.

Защитная функция 150 млрд. молекул ДНК-аз в 1 мл секрета слезных желез человека может быть весьма эффективной, потому что иногда одного удара нуклеазы достаточно, чтобы лишить нуклеиновую кислоту инфекционной активности [8, 9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Татарская Р. И. — Молекулярная биол., 1976, № 2, с. 235—259; № 3, с. 477—497. — 2. Гольдфарб Д. М., Замчук Л. А. Антитела к нуклеиновым кислотам. М., 1975. — 3. Хурсин М. Ю. — Физиол. ж., 1975, т. 21, № 4, с. 500—504. — 4. Lindberg U. — Biochemistry (Wash.), 1967, v. 6, p. 343—347. — 5. Шапот В. С. Нуклеазы. М., 1968, с. 149—157; 75—76; 73; 87. — 6. Gupta S., Herriot R. M. — Arch. Biochem., 1963, v. 101, p. 88—95. — 7. Bernardi G. — Advanc. Enzym. Regulat., 1968, v. 31, p. 1—50. — 8. Стент Г. Молекулярная генетика. М., 1974, с. 465. — 9. Young E. T., Sinsheimer R. L. — J. biol. Chem., 1965, v. 240, p. 1274—1280.

Поступила 26/XII 1977 г.

DETECTION OF DNAASES IN SECRETION OF HUMAN LACRIMAL GLANDS AND THEIR POSSIBLE ROLE

N. E. Khursin

Institute of Oncologic Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

DNAases were found in human tears by the method of horizontal viscosimetry. Their possible protective function, directed towards heterologous nucleic acids, is discussed.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.015.612:612.398.11

Д. А. Бабарыкин, М. Ю. Валиниче, В. К. Бауман

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА МЕТОДОМ РАДИАЛЬНОЙ ИММУНОДИФфуЗИИ

Отдел пересадки почки Центральной научно-исследовательской лаборатории Рижского медицинского института, лаборатория физиологии и биохимии животных Института биологии АН Латвийской ССР, Саласпилс

Описан метод определения кальцийсвязывающего белка с помощью радиальной иммунодиффузии в агаре. Метод нетрудоемок, обладает высокой чувствительностью и позволяет обнаружить от 0,5 до 40 мкг кальцийсвязывающего белка в образце.

Значительным событием в изучении роли витамина D в организме животных явилось открытие в слизистой оболочке тонкой кишки специфического кальцийсвязывающего белка (CaCB), биосинтез которого индуци-

руется витамином [11]. Установлена прямая корреляция между скоростью всасывания кальция и содержанием СаСБ в слизистой оболочке [2, 3]. Как недавно стало известно [4], биосинтез СаСБ индуцируется активным метаболитом витамина D — 1,25-дихолекальциферолом, образование которого осуществляется последовательно, в два этапа — вначале в печени [5] и затем в почках [6].

Содержание СаСБ в слизистой оболочке кишечника является наиболее адекватным показателем D-витаминного статуса организма животных [7] и человека [8], так как уровень кальция и фосфора в сыворотке крови и другие показатели (зольность костей, активность щелочной фосфатазы) зависят от многих факторов, связанных как с составом рациона, так и с физиологическими особенностями организма, а СаСБ является специфическим, витамин-D-зависимым белком [9].

Определение содержания СаСБ в тканях осуществляется электрофоретически в полиакриламидном геле [10] и иммунохимическими методами [2], которые являются более точными и совершенными.

Мы применили для определения СаСБ в слизистой оболочке тонкой кишки цыплят метод радиальной иммунодиффузии в агаре. В качестве экспериментальных животных были выбраны цыплята, потому что, во-первых, они являются классическим объектом изучения обмена витамина D, а во-вторых, определение СаСБ методом РИД у птиц лежит в основе биологического способа оценки антирахитической активности D-витаминных препаратов [11], что имеет важное практическое значение.

Методика

СаСБ выделяли из надосадочной жидкости гомогената слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки рахитичных цыплят через 72 ч после введения им 500 ИЕ витамина D₃. Освобождение от сопутствующих белков проводили высаливанием, центрифугированием и разделением на сфадексе до получения электрофоретически гомогенного СаСБ [12]. Раствор белка эмульгировали в равном объеме полного адьюванта Фрейнда, приготовленного по прописи Зильбера [13]. Кроликов иммунизировали по ранее описанной схеме [14]. Она включала введение эмульсии под кожу спины 4 животным в 6 мес из расчета 1 мг СаСБ на кролика. Через 7 нед производили дополнительное трехкратное введение по 0,25 мг белка без адьюванта с интервалами 7, 3 и 3 дня. На 65-й день после первой инъекции у животных брали кровь. Сыворотку лиофильно высушивали и хранили при 4°C в запаянных ампулах.

Специфичность антисыворотки проверяли методом двухмерной двойной диффузии в 1,5% агаре [15].

Радиальную иммунодиффузию осуществляли описанным методом [2]. Углубление 7×15 мм предложенной нами пластинки из органического стекла заполняли 0,5 мл 1,5% раствора бакт-агара «Дифко», приготовленного на мединаловом буфере pH-8,6, с добавлением 0,02% мертиолата, но без глицина. На поверхность агара наносили 0,05 мл антисыворотки (100 мг в 0,5 мл воды), которая диффундировала в гель в течение 10—15 ч. В углубление в центре агарового диска вводили 5 мкл образца. Пластинки инкубировали во влажной камере при комнатной температуре 1 сут. Четкость образовавшегося круга precipitation усиливали погружением пластинок в 0,02% раствор ацетата кадмия на 24 ч. Диаметр круга измеряли микроскопически.

На основании данных о зависимости диаметра круга precipitation от концентрации СаСБ строили калибровочную кривую. Зная величину круга, по калибровочной кривой определяли содержание СаСБ в изучаемом образце.

Результаты и обсуждение

Проверка специфичности антисыворотки к СаСБ методом двойной двухмерной диффузии в агаре показала, что полоса precipitation, соответствующая СаСБ, отсутствовала при анализе гомогената слизистой оболочки кишечника цыплят, не получавших витамина D, но появлялась после его введения. Данный метод позволил выявить наличие второй полосы precipitation, соответствующей примесному белку, который не удалось обнаружить с помощью электрофореза в 7% полиакриламидном геле раствора белка, использованного для иммунизации. Подобное явление наблюдали и другие авторы [14], производившие адсорбцию примесных антител с помощью

препарата нерастворимых белков гомогената слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки птиц с рахитом, применяя бис-диазотированный бензидин [16]. Этот метод неудобен тем, что вся процедура длится 15 ч без перерыва, а работа с бензидином, канцерогенным веществом, требует соблюдения особых мер предосторожности.

Мы осуществили очистку антисыворотки от примесных антител следующим образом. 20 % гомогенат слизистой оболочки готовили не из двенадцатиперстной кишки, а из нижележащего отдела, так как последний, по нашим данным [17], содержит меньшее количество СаСБ. Тем самым

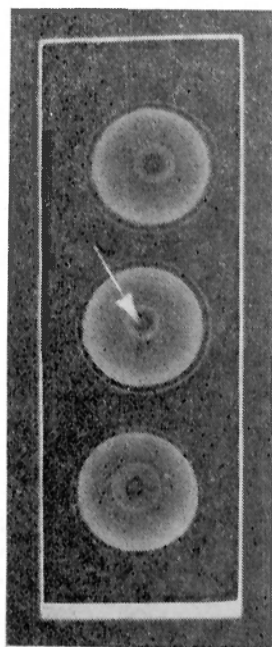


Рис. 1. Круги иммунопреципитации в агаровом геле.

уменьшается риск внесения в антисыворотку некоторого количества СаСБ, который может присутствовать в стенке кишки отдельных животных с рахитом. К гомогенату после нагревания при 60°C в течение 10 мин и последующего удаления осадка центрифугированием (30 мин при 4500 об/мин) добавляли равный объем 96 % этанола. Через 2 $\frac{1}{2}$ ч смесь центрифугировали. Осадок три раза промывали физиологическим раствором для удаления спирта.

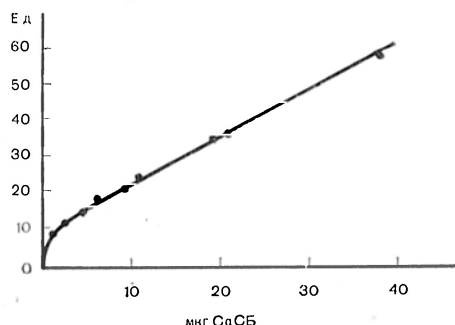


Рис. 2. График зависимости диаметра круга иммунопреципитации от содержания СаСБ в образце.

Каждая точка — средний результат 5 параллельных определений. На оси ординат — диаметр круга в условных единицах.

Препарат нерастворимых белков, полученный из тройного по сравнению с количеством сыворотки объема гомогената, переносили в колбу с сывороткой. Для улучшения контакта антиген — антитело содержащее колбы гомогенизировали тefлоновым пестиком 15 с при 1500 об/мин. Полученную суспензию центрифугировали на следующий день 30 мин при 4500 об/мин.

Анализ обработанной таким образом антисыворотки к СаСБ показал ее моноспецифичность.

Хранение лиофилизованной антисыворотки в течение 1 года не ухудшило иммунологических свойств последней.

Во время диффундирования антисыворотки в гель пластинки должны находиться в строго горизонтальном положении для обеспечения равномерной диффузии. При соблюдении этого требования круги преципитации получают правильной формы. Четкость кругов значительно увеличивается после обработки гелей ацетатом кадмия (рис. 1).

График зависимости диаметра круга преципитации от количества СаСБ построен с использованием 9 различных концентраций белка (рис. 2). Полученная зависимость подобна той, которую установили другие авторы [18]. Однако мы наблюдали линейную зависимость в более широких пределах концентраций СаСБ — 0,5—40 мкг.

Описываемый метод дает хорошо воспроизводимые результаты. При варьировании диаметра круга в зависимости от содержания изучаемого белка от 10 до 55 усл. ед. (11 усл. ед. соответствует 2 мм) результаты параллельных определений отличались на 1—2 усл. ед. При проведении экспериментов на большом числе птиц практически не требуется делать параллельные определения для одного образца.

Иммунохимический метод определения СаСБ имеет ряд преимуществ по сравнению с разработанным ранее способом количественного определения белка в круглых полиакриламидных гелях с использованием фотозлектроколориметра и стандартной кривой, построенной на основе сывороточного альбумина [18]. Метод радиальной иммунодиффузии дает возможность прямого определения СаСБ, без применения калибровочной кривой, построенной для другого белка, не требует специальной аппаратуры и имеет в несколько раз большую чувствительность. Одним из важных достоинств иммунохимической методики является небольшая трудоемкость всей процедуры.

Не существует принципиальных различий между методами определения СаСБ в слизистой оболочке кишечника птиц и млекопитающих, в частности человека. Поэтому разработка адекватной методики прижизненного определения СаСБ у человека даст возможность получить ценный диагностический показатель, значение которого особенно важно при нарушениях обмена витамина D.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wasserman R. H., Taylor A. N. — Science, 1966, v. 152, p. 791—798. — 2. Corradino R. A. — J. Cell. Biol., 1973, v. 58, p. 64—78. — 3. Emtage J. S., Lawson D. E. M., Kodicek E. — Biochem. J., 1974, v. 144, p. 339—346. — 4. Lawson D. E. M., Emtage J. S. — Biochem. Soc. Spec. Publ., 1974, v. 3, p. 75—90. — 5. Bhattacharyya M. H., Deluca H. F. — Arch. Biochem., 1974, v. 160, p. 58—65. — 6. Gray R., Boyle J., Deluca H. F. — Science, 1971, v. 172, p. 1232—1234. — 7. Бауман В. К., Валиниеве М. Ю. — Прикладная биохим., 1972, т. 8, с. 841—848. — 8. Piazzolo P., Schleyer M., Helmke K. et al. — In: Calcium Binding Proteins. Proceedings of the International Symposium. Warszawa, 1974, p. 791—805. — 9. Bronner F., Freund T. — Am. J. Physiol., 1975, v. 229, p. 689—694. — 10. Бауман В. К., Валиниеве М. Ю. — В кн.: Биохимия и физиология питания животных. Рига, 1972, с. 111—122. — 11. Bar A., Wasserman R. H. — J. Nutr., 1974, v. 1049, p. 1202—1207. — 12. Wasserman R. H., Corradino R. A., Taylor A. N. — J. Biol. Chem., 1968, v. 243, p. 3978—3986. — 13. Зильбер Л. А. Иммунохимический анализ. М., 1968. — 14. Таулог А. Н., Wasserman R. H. — J. Histochem. Cytochem., 1970, v. 18, p. 107—115. — 15. Ouchterlony O. — Acta path. microbiol. scand., 1953, v. 32, p. 321—327. — 16. Bernier G. M., Sebra J. J. — J. Immunol., 1965, v. 95, p. 246—253. — 17. Бауман В. К. — В кн.: Регуляторы роста и метаболизма животных. Рига, 1971, с. 85—96. — 18. Corradino R. A., Wasserman R. H. — Science, 1971, v. 172, p. 731—738. — 19. Бауман В. К., Валиниеве М. Ю. — В кн.: Биохимия и физиология питания животных. Рига, 1972, с. 125—130.

Поступила 22/VIII 1977 г.

QUANTITATIVE ESTIMATION OF Ca^{2+} -BINDING PROTEIN USING RADIAL IMMUNODIFFUSION

D. A. Babarykin, M. Yu. Valinietse, V. K. Bauman

Central Research Laboratory, Medical School, Riga, Institute of Biology, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Salaspils

A method is described for quantitative estimation of Ca^{2+} -binding protein in blood serum using radial immunodiffusion in agar gel. The method is not time-consuming and permits to evaluate 0.5–40 μg of Ca^{2+} -binding protein in the sample studied.

М. И. Кисурина, Г. Ф. Архипова, Е. П. Келин, Н. И. Микичур

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ УЛЬТРАМИКРОАНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ МАЛАТ- И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В БИОПТАТАХ МИОКАРДА БОЛЬНЫХ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения АН СССР, Новосибирский институт патологии кровообращения Министерства здравоохранения РСФСР

Описаны методы определения ферментативной активности малатдегидрогеназы (МДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в малом количестве миокарда больных пороками сердца. Сопоставление ультрамикрометода с обычным вариантом анализа показало соответствие результатов. Эти методы использовали для проведения комплексных исследований на биоптатах, полученных у больных при операциях на сердце и диагностическом зондировании.

К настоящему времени накопилось немало материалов об исследовании ряда сывороточных ферментов, в том числе ферментов энергетического обмена, креатинфосфокиназы (КФК) и др. у кардиологических больных. Результаты этих исследований позволяют сделать вывод о зависимости между тяжестью заболевания и активностью указанных ферментов [1—3, 4]. Результаты таких работ используются в клинике. Например, увеличение ферментативной активности КФК, ЛДГ и аспартаминотрансферазы в плазме крови является одним из ранних объективных признаков наличия инфаркта миокарда, опережающих электрокардиографические изменения [1]. У больных врожденными пороками сердца активность ЛДГ периферической крови увеличивается в 2—2½ раза при пороках бледного типа и в 4—5 раз — при пороках синего типа [4, 5]. При ревматических заболеваниях активность МДГ в плазме повышается почти в 2 раза по сравнению с нормой. В результате медикаментозного лечения активность ферментов нормализуется [6]. Интересно было определить, связаны ли нарушения активности ферментов, обнаруживаемые в крови при пороках сердца, с аналогичными изменениями в миокарде. Прижизненное исследование метаболизма миокарда стало возможным лишь с развитием кардиохирургии [7]. Серией работ установлено, что метаболические изменения миокарда при врожденных и приобретенных пороках сердца имеют определенные особенности; окислительно-восстановительные процессы значительно нарушаются по мере нарастания тяжести заболевания [8, 9]. При ревматическом стенозе и недостаточности митрального клапана интенсификация окислительного обмена сопровождается усилением анаэробного гликолиза [10]. В единичных исследованиях [11] обнаружено, что по мере утяжеления митрального стеноза увеличивается активность МДГ в миокарде при одновременном повышении ее уровня в крови. Однако для всех этих работ требуется значительное количество ткани. Нам встретилось лишь 2 сообщения о биохимическом анализе биоптатов миокарда, полученных при диагностическом зондировании [12, 13]. Авторы отмечают, что при наличии левожелудочковой недостаточности активность АТФ-азы уменьшается в 2 раза, активность МДГ снижается, а активность ЛДГ возрастает.

Мы поставили перед собой задачу показать, что определение активности ряда ферментов возможно в малом количестве ткани и что снижение анализа не приводит к несоответствию данных, получаемых при обычном варианте определения и при ультрамикроанализе. На первом этапе мы разработали методы одновременного анализа активности ЛДГ, терминального фермента гликолиза, и МДГ, катализирующей окислительное превращение последнего субстрата цикла трикарбоновых кислот — яблочной кислоты в щавелевоуксусную. Эти ферменты изучали в плазме при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях, методы их определения просты и удобны.

Методы исследования

Для определения ферментативной активности МДГ и ЛДГ использовали стандартные реактивы (LDH UV test, MDH UV test, Boehringer Mannheim GmbH).

Материалом для исследования служили биоптаты, полученные во время операций на сердце у больных врожденными и приобретенными пороками сердца, и биоптаты, взятые при диагностическом зондировании полостей сердца [14]. Пробы ткани тотчас после их взятия помещали в жидкий азот, гомогенизацию и все последующие операции проводили при охлаждении во льду. Суммарный гомогенат для анализа готовили из взвешенного кусочка биоптата. Из операционного биоптата гомогенат готовили в объеме 300 мкл 0,25 М трис-HCl буфера с 2,5% тритона путем гомогенизации в стеклянном гомогенизаторе. Операционный биоптат имел массу 1—2 мг. Для препаратов, полученных при зондировании, соотношение было иным: масса равнялась 0,1—0,3 мг, гомогенизацию проводили в 10 мкл буфера в гомогенизаторе, изготовленном из капилляров диаметром 1 мм. После центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин надосадочную жидкость отбирали и использовали в дальнейшем для анализа.

Состав реакционной смеси для определения активности МДГ: 300 мкл 42 мМ аспартата в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4, 5 мкл 65 мМ оксиглутарата, 5 мкл 12 мМ НАДН, 5 мкл раствора аспаратаминотрансферазы (0,1 мг/мл); для определения активности ЛДГ:

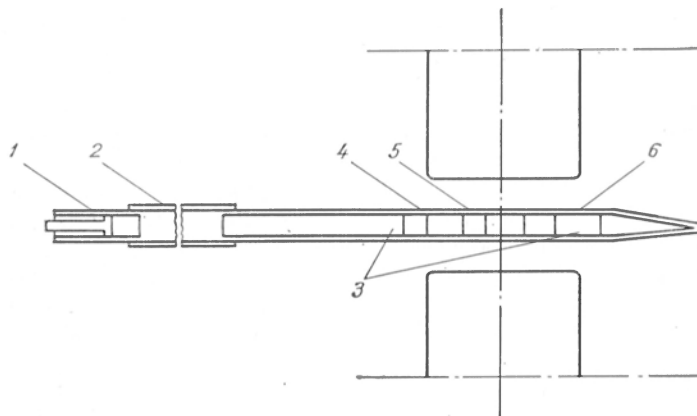


Рис. 1. Схема расположения капилляра в приборе.

1 — микрошприц; 2 — полиэтиленовый шланг; 3 — вода; 4 — тестовый раствор; 5 — реакционная смесь; 6 — капилляр.

300 мкл 0,6 мМ пирувата в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,5, 5 мкл 18 мМ НАДН. Отношение реакционной смеси (тестовый раствор и гомогенат 10:1):50 мкл + 5 мкл для операционного биоптата и 5 мкл + 0,5 мкл для биоптата, полученного при зондировании.

Прибор для ультрамикрoанализа, разработанный в Новосибирском институте органической химии, представляет собой двухволновый спектрофотометр, который позволяет измерять оптическую плотность в каплях раствора, находящихся внутри капилляра (рис. 1) [15]. Капилляры, изготовленные из увиолевого стекла, диаметром 250 — 300 мкм являются измерительными кюветами. Анализируемые капли разделяются между собой в капилляре промежутками воздуха. Для предотвращения адсорбции вещества на стенках капилляра предварительно прокальброванные капилляры обрабатывали фильтрованным спиртом, затем 3% диметилдихлорсиланом в бензоле, после чего подсушивали током воздуха и помещали в термостат на 1 ч при 100°C.

При проведении анализа в кювету сначала набирали тестовый раствор. После его смешения с гомогенатом тотчас брали смесь, через определенный промежуток воздуха набирали воду для предотвращения испарения с поверхности реакционной смеси. Затем устанавливали капилляр в прибор и регистрировали изменение оптической плотности в течение 3 мин на диаграммной ленте самописца. По полученной кинетической кривой рассчитывали активность ферментов, которую выражали в микромолях НАДН в минуту на 1 г влажной ткани. Кювету, в которой проводили измерение оптической плотности, термостатировали при 25°C [16].

Материал обрабатывали статистически методом наименьших квадратов [17].

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований был воспроизведен обычный вариант методик определения ЛДГ и МДГ, описанный в литературе [18, 19]. В основе их лежит принцип измерения активности ферментов по скорости окисления НАДН, прослеживаемого спектрофотометрически при 340 нм. Пер-

воначальная скорость окисления НАДН пропорциональна концентрации фермента [20], поэтому активность последнего определяли по начальному участку кинетической кривой.

При сопоставлении результатов ультрамикрометода с обычным вариантом анализа активности МДГ и ЛДГ одного и того же гомогената установлено их соответствие (табл. 1). Это сопоставление проводили следующим образом. К тестовому раствору МДГ и ЛДГ добавляли определенное количество гомогената, смесь разделяли на две части и регистрировали изменение оптической плотности одновременно в обычной кювете на СФ-4 и в капиллярной кювете двухволнового микроспектрофотометра. Микровариант анализа позволяет измерять активность указанных ферментов

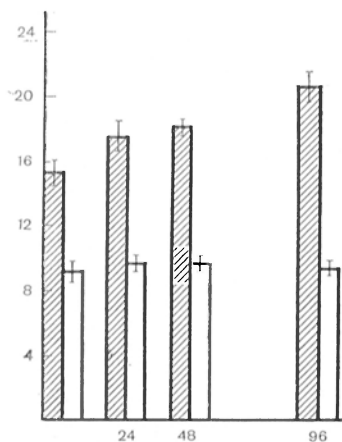


Рис. 2. Изменение активности ферментов при хранении гомогената без замораживания.

По оси абсцисс — время хранения гомогената (в ч); по оси ординат — активность ферментов (в мкмоль/мин на 1 г влажной ткани); заштрихованные столбики — активность МДГ; незаштрихованные — активность ЛДГ.

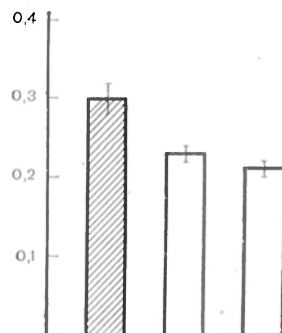


Рис. 3. Отношение ЛДГ/МДГ (в мкмоль/мин на 1 г влажной ткани) при митральной недостаточности (заштрихованные столбики) и митральном стенозе I и IV степеней (светлые столбики).

В пробах объемом 10^{-2} мкл, что обеспечивает снижение масштаба анализа на пять порядков по сравнению с микровариантом. Для каждого случая микроварианта определение активности ферментов повторяли. Подсчеты показали, что ошибка определения при таком варианте колеблется в пределах 3—5 %; это не превышает ошибки, встречающейся при использовании макрометода. Изучение изменений активности в зависимости от времени хранения гомогената в холодильнике без замораживания показало, что ЛДГ более устойчива по сравнению с МДГ (рис. 2). Учитывая это, в первую очередь определяли активность последней.

С помощью описанных методов мы провели серию анализов биоптатов миокарда при приобретенных пороках сердца (90 больных) и биоптатов миокарда, полученных при диагностическом зондировании (8 больных). Результаты представлены в виде отношения ЛДГ/МДГ, так как оказалось, что активность одного и того же фермента значительно варьирует в пределах одного заболевания. Из табл. 2, в которой представлены данные, полученные при анализе операционного биоптата больных с митральной недостаточностью, виден этот разброс. Причинами его могут быть индивидуальные различия активности ферментов и степень тяжести заболевания. Показатель ЛДГ/МДГ более стабилен и позволяет судить об относительной активности двух указанных ферментов. Анализируя активность ферментов при митральной недостаточности (22 больных) и митральном стенозе (68 больных), мы обнаружили достоверное различие в значениях отношения ЛДГ/МДГ между этими двумя заболеваниями (рис. 3). Однако это различие может быть обусловлено тем, что мы изучали разные отделы сердца: при

митральном стенозе — ушко левого предсердия, а при митральной недостаточности — папиллярную мышцу левого желудочка.

Разработанные методы могут быть использованы не только в период операции, но и при диагностическом зондировании. Мы исследовали пробы от больных двух групп: с кардиомиопатией и ревматическим митральным пороком сердца. Параллельно проводили гистологический контроль. Для больных 1-й группы среднее значение отношения ЛДГ/МДГ равно $0,62 \pm 0,06$, а для больных 2-й группы — $0,18 \pm 0,01$. Хотя эта группа немногочисленна, можно полагать, что такое различие в отношении ЛДГ/МДГ при кардиомиопатии и ревматическом митральном пороке сердца позволяет получить дополнительные сведения для дифференциальной диагностики.

Т а б л и ц а 1

Сопоставление результатов определения активности МДГ и ЛДГ с помощью макро- и микрометодов

| Макровариант | | Микровариант | |
|--------------|-----|--------------|-----|
| МДГ | ЛДГ | МДГ | ЛДГ |
| 49 | 8 | 42 | 10 |
| 32 | 18 | 38 | 14 |
| 30 | 7 | 28 | 10 |
| 67 | 22 | 71 | 29 |

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 показатели даны в микромолях в минуту на 1 г влажной ткани.

Т а б л и ц а 2

Активность ЛДГ и МДГ и их отношение в миокарде больных с митральной недостаточностью

| ЛДГ | МДГ | Отношение ЛДГ/МДГ |
|------|------|-------------------|
| 29,1 | 72,3 | 0,40 |
| 33,7 | 67,6 | 0,49 |
| 13,0 | 31,0 | 0,41 |
| 11,9 | 26,7 | 0,44 |
| 31,8 | 71,7 | 0,44 |
| 25,0 | 58,8 | 0,42 |
| 17,5 | 36,9 | 0,47 |

Следует отметить, что нами получены сходные данные по ревматическим порокам при анализе биоптатов, взятых во время зондирования ($0,18 \pm 0,01$), и в операционных ($0,21 \pm 0,02$).

Возможности определения активности ферментов в микропробах не ограничиваются только этими двумя ферментами. Нами накоплен материал об активности гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в микропробах миокарда и печени больных с сердечной патологией. Это позволяет по небольшому количеству ткани составить представление о ферментативной активности миокарда или другого органа при различных заболеваниях, что способствует разработке методов ранней диагностики.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Клиническая ферментология. Под ред. Э. Щеклика. Варшава, 1966. —
2. Евнина И. И., Нагичева Л. Н., Алкс А. О. — Кровообращение, 1974, № 2, с. 30—35. — 3. Galen R. S. — Hum. Path., 1975, v. 6, p. 141—155. —
4. Евнина И. И., Келин Е. П., Могилевская Г. П. и др. — Грудная хир., 1971, № 1, с. 55. — 5. Light R. W., Bell W. R. — Arch. intern. Med., 1974, v. 133, p. 372—376. — 6. Зборовский А. Б., Мартемьянов В. Ф. — Вопр. ревмат., 1974, № 3, с. 17—20. — 7. Мешалкин Е. Н., Архипова Г. Ф., Ткачева В. М. и др. — В кн.: Итоговая науч. сессия по вопросам патологии и хирургической коррекции кровообращения. 2-я. Материалы. Новосибирск, 1964, с. 33. — 8. Архипова Г. Ф., Часовских Г. Г., Ткачева В. М. и др. — В кн.: Гипертония большого и малого круга кровообращения. М., 1966, с. 239. — 9. Архипова Г. Ф., Келин Е. П., Кириченко В. М. и др. — Кровообращение, 1977, № 2, с. 13—19. — 10. Кухта В. К. — Вопр. мед. химии, 1976, № 3, с. 325—328. — 11. Peters T. J., Bloomfield F. L., Oakley C. M. — Postgrad. med. J., 1975, v. 51, p. 298. — 12. Peters T. J., Brooksby J. A., Webb B. et al. — Lancet, 1976, v. 1, p. 269—270. — 13. Мешалкин Е. Н., Антонов О. С., Нарцисов В. С. и др. — Кардиология, 1973, № 1, с. 79—81. — 14. Микичур Н. И., Сандахчиев Л. С., Шелкунов С. В. — Изв. Сибирск. отд. АН СССР, 1975, № 3, с. 76—80. — 15. Bergmeyer H. U. — Z. klin. Chem. klin. Biochem., 1973, Bd 11, S. 39—45. — 16. Wroblevski F. et al. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1955, v. 90, p. 210. — 17. Bergmeyer H. U. Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim, 1965. — 18. Severo O. Meth. Enzymol., 1955, v. 1, p. 735—738.

Поступила 20/VI 1977 г

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ПОМЕЩЕННЫХ В 1978 ГОДУ В ЖУРНАЛЕ «ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ»

- Акопов М. А., Березов Т. Т., Каган З. С. Некоторые особенности L-треанин- и L-сериндегидратазы печени мышей и спонтанных гепатом. 3, 394.
- Алейникова Т. Д., Валдина Е. А., Монахов Н. К. Каталитические свойства и изоферментный состав гексокиназы в нормальной и опухолевой ткани щитовидной железы. 3, 390.
- Александрова С. С., Никольская И. И., Дебов С. С. Фракционирование и очистка ферментов метилирования ДНК из клеток *Escherichia coli* СК на фосфоцеллюлозе Р-11. 5, 694.
- Александрович А. Г., Ананьева Г. В., Димитрова А. И., Константинова 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. 5, 620.
- Алматов К. Т., Рахимов М. М. Функционирование митохондрий печени крыс при гепатите. 6, 740.
- Антипенко А. Е., Бубеев Ю. А., Коровкин Б. Ф., Михалева Н. П. Система ПАМФ в мышечной ткани при длительной гипоккинезии. 6, 765.
- Атабекова Г. А., Кошеев Н. Н., Романцев Е. Ф. Изменение внутриклеточного фонда АТФ в тканях крыс после ее введения. 3, 401.
- Атаханова Б. А., Туракулов Я. Х., Ташмухамедова М., Шеталова М. В. Биосинтез белков в бесклеточной белоксинтезирующей системе из клеток рака щитовидной железы. 6, 802.
- Базанов Е. А., Воробьева Л. П., Бренер Е. Д., Подольская О. В., Сучков В. В., Герасимова Е. Н., Лебедева Л. Н., Ткаченко К. Н. Особенности обмена коллагена сосудистой стенки при изменениях центрально-вегетативной регуляции. 1, 96.
- Балаба Т. Я., Фурцева Л. Н., Шинкаренко И. Н., Абдуразаков У. А. Обмен коллагена при контрактуре Дюпюитрена. 6, 818.
- Барабаш Р. Д., Левицкий А. П. Ферментативные механизмы антимикробной защиты ротовой полости. 3, 291.
- Белик Я. В., Терлецкая Я. Т., Козулина Е. П., Сыроватская Л. П., Гершкович А. А., Кибирев В. К., Серебряный С. Б. Изучение лечебного действия основного белка миелина и синтетического энцефалитогенного пептида у морских свинок с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом. 3, 372.
- Бельченко Д. И., Доманский В. Ю., Ханина Н. Я. Изоферментный спектр и активность некоторых ферментов эритроидных и миелоидных клеток костного мозга кролика и особенности их изменений под влиянием гидрокортизона. 4, 464.
- Белобрагина Г. В., Медведев Л. А. Изменение содержания ряда компонентов соединительной ткани легких крыс в процессе старения. 1, 123.
- Блеян Г. Т., Погосян А. С., Степанян М. А., Осипова Э. Н. Роль кининовой системы крови в патогенезе геморрагического синдрома при геморрагическом васкулите. 6, 779.
- Бодиев Р. Д. Д., Чиркина Т. Ф. Обнаружение противотканевых антител в сыворотке крови крыс при введении нитритов. 6, 733.
- 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. 5, 608.
- Бронштейн Л. М., Аиисимов А. А., Облизина Г. В., Дубовская С. С., Рабинович И. Ш. Влияние обеспеченности организма витамином К на электрофоретическую характеристику белков эритроцитарных мембран. 1, 80.
- Будякова Г. Н., Левин Б. Ф., Кузнецова Л. В., Березов Т. Т. Исследование активности некоторых ферментов аневризмы и внеинфарктной зоны миокарда крыс после экспериментального инфаркта. 3, 352.
- Бурлакова Е. Б., Пальмина Н. П., Сезина И. П. Реакция опухоли и органов животного-опухоленосителя на введение синтетического антиоксиданта. 3, 368.
- Бышевский А. Ш. и Колесник Н. В. Суточный ритм активности лимитирующих ферментов пентозофосфатного пути в печени крыс. 3, 338.
- Бышевский А. Ш., Лапушева Т. М., Мухачева И. А. Влияние фосфатидилсерина на образование и лизис фибрина. 4, 510.
- Ваняев Б. И. Распределение радиоактивного фосфора (^{32}P) и интенсивность обмена АИФ в сердечной мышце крыс в условиях частичной парасимпатэктомии и физической нагрузки. 5, 600.

- Векслер Я. И., Магомедова К. М., Луговцев В. М. Особенности метаболической реакции центральной нервной системы на стресс при острой алкогольной интоксикации. 2, 180.
- Величко М. Г., Островский Ю. М., Требухина Р. В. Тиамин и обмен пирувата у крыс-опухоленосителей. 2, 220.
- Веремеенко К. Н., Лосицкая В. М., Голобородько О. П., Костюченко Е. С., Вишняк И. Е. Исследование протеолитических ферментов лейкоцитов крови человека. 4, 550.
- Верхратский Н. С. Особенности влияния ацетилхолина на биосинтез белка в отделах сердца взрослых и старых крыс. 5, 648.
- Виноградов В. В., Струмило С. А., Мандрик К. А., Островский Ю. М. Изучение тиамин- и тиаминдифосфатсвязывающей способности гиалоплазматической фракции печени крыс. 3, 383.
- Волжина-Атабегова Н. Г. Взаимосвязь основных путей превращения углеводов в мозге при гипотермии. 3, 330.
- Воронков Г. С. Особенности элиминации адреналина и норадреналина из крови крыс разного возраста. 5, 632.
- Воскобойников Г. В., Хансон К. П. Содержание тиаминосоединений в моче больных при определении с помощью йод-азидного реагента и по реакции с селенистой кислотой. 2, 193.
- Габриэлян Н. И., Могирева И. А. Изучение токсического фактора печеночных экстрактов, 3, 341.
- 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. 5, 657.
- Гобеев В. И., Хрипач Л. В., Березов Т. Т. Некоторые биохимические характеристики печени высоко- и низкоразовых линий мышей и первичных спонтанных гепатом. 4, 533.
- Головенко Н. Я. Синтез аминоклеточных гликозидов в организме белых крыс. Зависимость процесса от физико-химических свойств субстрата, 5, 676.
- Головенко Н. Я., Карасева Т. Л., Курушин А. А. Ацетилирование 7-аминопроизводного нитразена субклеточными фракциями некоторых органов и кровью белых крыс. 6, 839.
- Горюхина О. А., Ткаченко А. А. Выделение катионных белков из тромбоцитов крови кроликов и изучение их бактериостатической активности. 1, 17.
- Гридина Л. И., Левицкий А. П., Вовчук С. В. Протеолитические ферменты слюны и десны человека. 3, 407.
- Гуркало В. К., Третьяков А. В. Изменения активности моноаминоксидазы, аденилатциклазы и аденозинтрифосфатазы в митохондриях клеток печени в процессе гепатоканцерогенеза. 4, 495.
- 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. 5, 652.
- Деев А. И., Еремина Т. В., Спиричев В. Б. Влияние ретинола на перекисное окисление в фосфолипидных мембранах. 6, 795.
- Делекторская Л. Н. О выборе оптимальных условий измерения активности аспартат-аминотрансферазы. 1, 92.
- Егорова В. А., Беляева З. Н., Блинов М. Н. Активность аденилатциклазы кровяных пластинок человека при некоторых заболеваниях системы крови. 1, 28.
- Елаева Н. Л., Стройков Ю. Н. Влияние эзерина на синтез ДНК в печени крысы. 4, 461.
- Житнухин Ю. Л., Плещков В. М. Выделение и анализ энцефалитогенных фракций белков спинного мозга. 1, 57.
- Зубер В. Л. Интенсивность обмена отдельных фракций фосфолипидов мозга при гиперфенилаланинемии. 2, 163.
- Зубер В. Л., Таранова Н. П. Влияние экспериментального аллергического энцефаломиелита на интенсивность обмена фосфолипидов головного и спинного мозга. 3, 322.
- Зубкова С. М., Соколова З. А. Состояние митохондрий и хроматина ядер нервных клеток коры головного мозга при лазерном облучении. 3, 326.
- Зыкова В. П., Бочкарева Е. В., Владимиров С. С., Беляева Т. Е. Экстракция, разделение и количественное определение простагландин в плазме крови, тромбоцитах и некоторых тканях. 4, 514.
- Иванов Г. Г. Распределение и некоторые свойства щелочной фосфатазы в слизистой оболочке желудка человека при язвенной болезни. 2, 206.
- Иванов В. В., Кузнецова Г. П., Арчаков А. И. Стимуляция акрилонитрилом перекис-

- ного окисления липидов в печени крыс. 6, 816.
- Исеева В. А., Спиричев В. Б. Относительное содержание α -, β - и γ -цепей растворимых фракций коллагена костной ткани крыс при различной обеспеченности витамином D. 2, 270.
- Кайкова В. М. О содержании основных липидных фракций в миокарде различных отделов сердца здоровых людей. 1, 46.
- Калинкин М. Н., Бельченко Д. И. Влияние длительного введения атерогенных фракций липопротеидов на липидограмму крови и миокарда кроликов. 2, 147.
- Капинос И. К. Влияние депервации на углеводный обмен в печени. 4, 453.
- Карагезян К. Г., Овсепян Л. М., Дадаян М. А., Адопц К. Г. Изучение перекисного окисления и антиокислительной активности липидов при экспериментальном панкреатите. 1, 73.
- Карелин А. А. Цикло-3', 5'-АМФ в регуляции биосинтеза креатина у млекопитающих: цикло-АМФ-опосредуемая гормональная активация гуанидинацетат-N-метилтрансферазы. 4, 435.
- Карпова О. Б., Обухова Е. Л., Аврова Н. Ф. и Шварц Е. И. Содержание и состав ганглиозидов мозга при болезни Дауна. 4, 524.
- Кашкин К. П., Никифорова Н. А. Активность некоторых изоферментов сердечной мышцы, почек и сыворотки крови при экспериментальной стафилококковой инфекции. 1, 35.
- Керимов Т. М., Перова Н. В., Сучкова С. Н., Щербакова И. А., Герасимова Е. Н., Рууге Э. К. Исследование липопротеидов плазмы методом спинных меток. 4, 559.
- Киреев М. М., Конвай В. Д. Нуклеотидный фонд головного мозга крыс в различные периоды умирания организма. 5, 628.
- Кирилюк А. Г., Хмелевский Ю. В. Механизмы взаимодействия витаминов B₁ и PP при всасывании в кишечнике крыс. 1, 67.
- Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Нагорнев В. А., Зубжицкий Ю. Н., Петрова-Маслакова Л. Г., Баньковская Э. Б., Маграчева Е. Я., Олейник И. А. О природе липопротеидного антигена, ответственного за развитие устойчивости к экспериментальному атеросклерозу после иммунизации им новорожденных кроликов. 1, 131.
- Климов А. Н., Денисенко А. Д., Зубжицкий Ю. Н., Герчикова Е. А. Обнаружение аутоиммунного комплекса липопротеид-антитело в плазме крови и стенке аорты человека. 4, 539.
- Клюева Н. Н. Влияние стероидных гормонов на активность глутаматдегидрогеназы митохондрий печени крыс. 1, 49.
- Кобляков В. А., Коляда А. Ю. Изучение состояния ферментной системы микросомальных оксигеназ при хроническом введении 2-ацетиламинофлуорена. 1, 113.
- Козлов Е. А., Петрий О. П. Имобилизованная аспарагиназа и ее использование в медицине. 6, 723.
- Коннова Л. А. Фракционный состав кислых гликозаминогликанов аорты кролика при развитии гиперхолестеринемии. 5, 591.
- Косик О. Г., Троицкий Г. В., Павлюк В. Г., Галахин К. Д., Тоскина М. К. Физико-химические свойства иммуноглобулина G из сыворотки крови тиреоидэктомированных кроликов. 6, 827.
- Кричевская А. А., Шугалей В. С., Цветненко Е. З., Ананиян А. А. Защитное действие аргинина при гипероксии. Активность глутаминазы и глутаматдекарбоксилазы мозга. 1, 42.
- Кричевская А. А., Лукаш А. И., Пушкина Н. В., Шерстнев К. Б. Спонтанное дезамидирование γ -глобулина. 2, 160.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. Значение комплекса фибриноген-гепарин в фибринолитической активности эуглобулиновой фракции крови после внутривенного введения тромбина или плазмина. 2, 255.
- Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Баскакова Г. М., Ляпина Л. А., Чакалева И. И. Влияние гепарина на концентрацию сахара крови при аллоксановом диабете у крыс. 4, 520.
- Кузьмак Н. И. Влияние тиреостатических препаратов и тиреоидэктомии на содержание сиаловых кислот в сыворотке крови и печени у крыс. 1, 52.
- Кулинский В. И. Использование определения активности катехоло-метилтрансферазы для оценки состояния обмена катехоламинов у человека. 5, 645.
- Ларионов Н. П. О состоянии гликолитической системы в гипертрофированном сердце. 1, 7.
- Ларионов Н. П., Кротенко Н. М. Сравнительное исследование изменений АТФ-азной активности актомиозина и активности гликолитических ферментов скелетных мышц в раннем постнатальном периоде развития. 2, 202.

- Л а ш а к Л. К., Т р е б у х и н а Р. В., О с т р о в с к и й Ю. М. Превращения глюкозо-6-фосфата в тканях животных, получающих высокие дозы окситиамина или тиамина. 6, 822.
- Л е б е д е в Д. А. Обмен коллагена при системной склеродермии. 6, 789.
- Л е в и т о в а Е. Н., Л о б о в а Н. М. Расщепление липопротеидлипазой фракции липопротеидов очень низкой плотности из сыворотки крови здоровых и больных атеросклерозом людей. 4, 483.
- Л и н и ц к а я Г. Л., Я ц ы н а А. А. Пушкарская Н. Л., Г а л е г о в Г. А. Влияние рибовирина (1-В-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. 5, 699.
- Л у г а н о в а И. С., Б л и н о в М. Н., А б д у л к а д ы р о в а А. С. Возрастной состав эритроцитарной популяции, содержание АТФ и 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах при некоторых формах гемолитических анемий. 4, 499.
- М а к е в н и н а М. Г., К у д о к о ц е в а Е. В., Д о б р е ц о в Г. Е., Б е л о у с А. М. Влияние низких температур на функциональное состояние мембран эндоплазматического ретикулаума печени. 5, 606.
- М е е р с о н Ф. З., Я в и ч М. П., Г о р а ч Г. Г. Метаболизм поли-А-содержащей и РНК миокарда в норме и при компенсаторной гиперфункции сердца. 2, 275.
- М е е р с о н Ф. З., П ш е н н и к о в а М. Г., Г о л у б е в а Л. П., Я н и ш е в с к и Е., К р а у з е Э. Г., В о л л е н б е р г е р А. Влияние адаптации к высотной гипоксии и холоду на активность аденилциклазы миокарда крыс. 4, 486.
- М е е р с о н Ф. З., П а в л о в а В. И., К а м и л о в Ф. Х., Я к у ш е в В. С. Нарушения энергетического метаболизма печени при эмоционально-болевым стрессе и предупреждение этих нарушений гемма-оксибутиратом натрия. 6, 774.
- М е р к у р ь е в а Р. В., Б у ш и н с к а я Л. И., А у л и к а Б. В., Ш а т е р н и к о в а И. С., П р о ц е н к о Е. И., К у л ы г и н а А. А., Э к с л е р Н. Д. Активность лизосомальных и цитоплазматических ферментов при экспериментальном действии сероуглерода. 2, 151.
- М и х а й л о в В. В., О т д е л ь н о в а Н. Н. Биогенные амины и функциональное состояние печени при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите и постдифтерийном полиневрите у собак. 4, 469.
- М о р р и с о н В. В. Об изменении уровня гистамина и серотонина в парате внешнего дыхания при ботулинической интоксикации у кошек. 2, 224.
- М у ж и ч е н к о А. В., Н и к о л ь с к а я О. Н., Х а р д и н а Г. А. Влияние брюшнотифозного эндотоксина на содержание общих и нейтральных липидов в ткани печени мышей. 3, 334.
- Н и к и т и н а З. К., Ш и ш к и н С. С., Т о м а ш е в и ч С. В., Д е б о в С. С. Изучение деградации рибосомной РНК в скелетной мышце крыс в процессе автолиза. 2, 262.
- Н и к и ф о р о в а А. А., Ч и с т ы к о в а А. М., М а т в е е в И. И., Т е р ю к о в а Н. П., А р х и п о в О. П., К л и о р и н А. И., К л и м о в А. Н. Сравнительная недостаточность лецитин — холестерин — ацетилтрансферазы в крови новорожденных. Сопоставление эстерифицирующей активности плазмы крови новорожденного и матери — роже-ницы. 1, 87.
- Н и к и ф о р о в а А. А., Ч и с т ы к о в а А. М., М а т в е е в И. И., Т е р ю к о в а Н. П., Л и в ч а к М. Я., М а г р а ч е в а Е. Я., К л и м о в А. Н. Химический состав липопротеидов высокой и низкой плотности плазмы крови новорожденных. 1, 118.
- Н и к о л ь с к а я И. И., Л о п а т и н а Н. Г., Р е к у н о в а В. Н., Ю р к е в и ч А. М., Д е б о в С. С. О влиянии S-нуклеозил-L-гомоцистеинов на активность некоторых метилаз ДНК. 2, 252.
- Н о с о в а И. М., К о т к и н а Т. И., З а е ц Т. Л. Влияние контрикала на активность лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и их изоферменты в органах и тканях обожженных животных. 5, 595.
- О б о л е н с к а я М. Ю., Л е в и ц к и й Е. Л. Возрастные особенности репликации ДНК в регенерирующей печени крыс. 3, 345.
- О г н е в а В. К., Р е п и н В. С., Ч е р н ы в с к и й В. А. Характеристика белкового состава и синтез белка в изолированных островках Лангерганса поджелудочной железы крыс в норме и при аллоксановом диабете. 1, 62.
- О г о р о д н и к о в а Л. Г. Влияние ишемии мозга на содержание гликогена в печени и мышцах. 6, 786.
- П а н е в с к а я Г. Н., Я р о ш А. М., Н е с т е р о в Е. Н. Изменение антирадикальной активности липидов сурфактанта при развитии неспецифического воспалительного процесса бронхолегочной ткани у кроликов. 3, 412.
- П е в з н е р Д. Л., Б а л а ш о в а Е. К., К р у г л о в а Э. Э., Р о з е н г а р т В. И., Ш е р с т о б и т о в О. Е., А б д у в а х а б о в А. А. Внутриклеточное распределение фосфоорганических ин-

- гибиторов холинэстеразы в мозге крыс. 6, 758.
- Перцева М. Н., Желудкова З. П., Кузнецова Л. А. О взаимодействии цГМФ и цАМФ в их влиянии на углеводный метаболизм мышц. 4, 258.
- Плетень А. П., Мазо В. К., Никуличева С. И., Шатерников В. А. Выделение и очистка ангиотензиногена из плазмы крови свиней и овец. 6, 798.
- Погосова А. В., Петухова Л. М., Никулин В. И., Коникова А. С. Значение постмортального охлаждения для восстановления метаболизма при оживлении. 6, 811.
- Подвигина Т. Т., Трошихин Г. В. Влияние гипероксии в сочетании с введением гидрокортизона на дыхание митохондрий мозга крыс. 6, 762.
- Поликарпова Л. И., Резник С. Э., Рыженков В. В., Хечинашвили Г. Г., Петрова Л. А., Мухина Н. И., Безрукова О. А. Гиполипидемическая активность веществ, структурно близких пенифенону, у крыс и мышей. 6, 836.
- Попов А. В., Виноградов А. Г., Надточий В. В. Электронно-автордиографическое и биохимическое изучение роли пенных клеток в метаболизме липопротеидов низкой плотности. 1, 109.
- Попов А. В., Кузнецов А. С., Лозовский В. Т. Гликозаминоглики в составе липид-белковых комплексов аорты человека. 5, 670.
- Попова Г. М. Церебровиды глимоза человека. 2, 169.
- Потребич А. В., Данилина И. А. Влияние комплексных соединений гепарина с фибриногеном на процесс фибринообразования. 3, 404.
- Прашквичюс А., Лукошквичюс Л., Йокубаускаене В. - Н. Ацетилирование сульфаниламида и содержание кофермента А в сердечной мышце и печени при экспериментальном некрозе сердечной мышцы. 4, 475.
- Проценко В. А., Богадельников И. В., Спицын И. Ф. Антипротеазная активность сыворотки крови при парентеральном введении протеолитических ферментов гистамина и ацетилхолина. 6, 736.
- Пушкарская Н. Л., Дикий В. В., Галегов Г. А. Влияние 1-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамидов на синтез клеточных макромолекул в культуре клеток. 1, 84.
- Розенфельд Е. Л., Розе Л. В. Влияние биогенных аминов на фосфолиз и γ -амилолиз гликогена в сердечной мышце крысы при анестезии. 5, 690.
- Ронинсон И. Б. и Народицкий Б. С. Изучение функциональной организации ДНК Папова-и аденовирусов. 5, 579.
- Рудник В. С. Фосфофруктокиназная активность чумного микроба. 1, 127.
- Саратиков А. С., Мари-на Т. Ф., Фисанова Л. Л. О механизме влияния салидрозидов на обмен катехоламинов мозга. 5, 624.
- Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С., Арзанунц Э. М. Об активирующем действии индолилгидразитов на моноаминоксилазу мозга крыс. 5, 640.
- Свириновский А. И., Шиманская Т. В., Левин В. И., Бакун А. В. Нуклеазная активность в лейкозно измененной лимфоидной ткани. 4, 479.
- Сергеев А. В., Быковская С. Н., Раушенбах М. О. Биосинтез пиридоксаль-5'-фосфата в лимфоцитах, стимулированных аллоантигенами *in vitro*. 2, 211.
- Силуянова С. Н., Еременко В. В. Фосфорилирование тимидина с участием тимидинкиназы из слюнной железы и печени крыс в присутствии фактора из *Cl. perfringens* (welchii). 2, 184.
- Симхович Б. З. Активность аденилциклазы в клетках асцитной карциномы Эрлиха *in vitro*. 6, 768.
- Сковронская Е. В. Метаболизм печени при массивной кровопотере и ее возмещении. 1, 22.
- Соболева И. В., Субханкулова Ф. Б., Минебаев М. М., Зубанров Д. М. Циркуляция растворимого фибрин-мономера в организме. 3, 358.
- Содиков Э. С., Казаков К. С. Некоторые новые аспекты действия изониазида на активность трансаминаз при туберкулезе. 1, 3.
- Соколов А. В., Козляева Г. А., Месняпкина Н. В., Татаринцев Ю. С. Выделение и очистка специфического β_1 -глобулина. 2, 240.
- Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В., Богословский Н. А., Самохвалов Г. И., Авакумов В. М., Исаева В., Поздняков А. Л., Соколова С. К., Переверзева О. Г., Рязанцева Л. Д., Соколова С. В., Фернандес Р. Сравнительное изучение биологической активности и токсического действия 1- α -оксихолекальциферола и эргокальциферола на крысах. 5, 679.
- Суббота Н. П., Белоус А. М. Концентрация цитохромов при различных сроках и низкотемпературных условиях хранения гомогенатов коры почки крысы. 2, 156.
- Суринов Б. П. Распределение в тканях и некоторые свойства мно-

- жественных форм кислой фосфатазы. 4, 450.
- Сыров В. Н., Курмуков А. Г., Сахибов А. Д. Влияние туркестерона и перобола на активность белоксинтезирующей системы печени мышей. 4, 456.
- Сычева Г. Ф., Давыдов А. А., Арсеньев С. А., Бондаренко А. В., Емельянов Н. И., Зборовский А. Б. Изучение молекулярного веса актина скелетной и сердечной мышц человека методом электрофореза в полиакриламидном геле. 3, 314.
- Таранова Н. П. Гликолипиды головного и спинного мозга морских свинок при интоксикации трикрезилфосфатом. 2, 188.
- Таранова Н. П. Включение 2^{14}C -ацетата в гликолипиды спинного и ствол головного мозга морских свинок в норме и в паралитической стадии интоксикации триортокрезилфосфатом. 5, 636.
- Татьяненко Л. В., Райхман Л. М., Веревкина И. В., Васюкова Н. В. Участие моноаминоксидазы типа Б в регуляции Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы саркоплазматического ретикулула. 4, 548.
- Тесленко Л. В., Усатенко М. С. Активность валил- и аланил-тРНК-синтез в скелетных мышцах кролика при диабете и введении в организм инсулина. 2, 172.
- Титов В. Н., Пицин Д. Г. О патогенезе гиперлипопротеидемии у крыс после введения этанола. 2, 244.
- Трухан А. С., Петровский Г. Г., Хмара Н. Ф., Маслова Г. Т. Хинопредуцирующая активность тромбоцитов. 3, 347.
- Уласевич И. И. Влияние витамина К на перекисное окисление липидов в условиях I-авитаминоза. 2, 260.
- Усова А. А., Остапенко И. А., Этингер Р. Н. Белковый ингибитор фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов в сетчатке при ее наследственной дегенерации. 2, 227.
- Фанченко Н. Д., Минина Л. С., Щедрина Р. Н. Особенности эстрадиол-рецепторного взаимодействия в цитозоле фаллопиевых труб человека. 2, 198.
- Федуров В. В. Активация включения меченых предшественников в убихинон в срезах гипертрофированной почки крысы. 1, 77.
- Федуров В. В. Регуляция обмена убихинонов: исследование в регенерирующей печени крыс. 2, 232.
- Фесенко В. П., Бабалич А. К. Некоторые показатели кининовой системы при заболеваниях щитовидной железы. 6, 781.
- Филиппова В. Н., Филановская Л. И., Блинов М. Н., Ушакова Е. А. Изменение термостабильности АМФ- и ИМФ-пирофосфорилазы лейкоцитов при лейкозах. 5, 666.
- Фицнер А. Б. Обмен I-альбумина в срезах печени крыс. 6, 832.
- Флеров М. А. Распределение и метаболизм фосфолипидов нейронов и нейроглии. 2, 174.
- Фамина М. П. Влияние голодания и диабета на активность дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата и содержание свободных жирных кислот в коре и мозговом веществе почки крыс. 3, 377.
- Фролькис В. В., Безруков В. Р., Мурадян Х. К. Синтез фракций РНК печени крыс при однократном и многократном раздражении гипоталамуса. 1, 12.
- Фролькис Р. А., Гунина Л. М. Изменения калликреин-кининовой системы крови в процессе развития экспериментального инфаркта миокарда. 6, 747.
- Хватова Е. М., Лавровский С. Н. Изоферменты лактатдегидрогеназы мозга в разных условиях кислородного голодания. 1, 31.
- Хомулло Г. В., Травкина В. М., Рыжова Т. И., Кокорева Г. А. Состояние белкового и минерального обмена при введении тирокальцитонина в условиях экспериментального остеогенеза. 5, 609.
- Хохлов А. П., Малаховский В. К. Особенности обмена циклического $3'$, $5'$ -АМФ у больных прогрессирующими мышечными дистрофиями. 6, 754.
- Хурсин Н. Е. Обнаружение и возможная роль ДНК-аз в секрете слезных желез человека. 6, 845.
- Цветкова И. В., Козина А. Б., Розенфельд Е. Л., Осипова Г. Н. Биохимическая диагностика ганглиозидоза ГМ₁. 4, 566.
- Цукерман Д. Б., Веревкина И. В., Горкин В. З. Окисление моноаминов в митохондриальной фракции почек быка, катализируемое моноаминоксилазой типа Б. 4, 544.
- Чаяло П. П. Характер изменения некоторых показателей обмена липидов в печени на ранних стадиях экспериментального атеросклероза в связи с возрастом. 6, 806.
- Черкасская М. Д., Ясаятис А. А. Влияние 2,3-диацетоксибензойной кислоты на энергетические параметры изолированных митохондрий печени крыс. 3, 316.
- Чеснокова Н. П. К вопросу о взаимосвязи активности холинергических процессов с метаболизмом катехоламинов при ботулинической интоксикации. 4, 490.
- Чеснокова Н. П. Влияние активности адренергических процессов

- на содержание катехоламинов в тканях. 4, 505.
- Чибисов И. В., Карманский И. М., Шеляпина В. В., Леонтьев А. Ф., Розенфельд Е. Л. Липопротеиды сыроворотки крови при генерализованной форме гликогеноза III типа. 4, 555.
- Шамов И. А., Векслер Я. И., Асланова Н. Р. Изменение содержания адениннуклеотидов, креатинфосфата и активности фермента креатинкиназы в слизистой оболочке толстой кишки у больных хроническим энтероколитом в зависимости от тяжести течения болезни. 3, 310.
- Шатаева Л. К., Чернова И. А., Самсонов Г. В., Кобринский Г. Д., Соловьев В. Д., Домарадский И. В. Выделение и свойства нейраминидазы холерных вибрионов. 4, 569.
- Швецкий А. Г., Воробьева Л. М. О влиянии неспецифических биогенных симуляторов пентоксила и мумие на некоторые обменные процессы. 1, 102.
- Шенкман Б. З. Об инаktivации тканями желудочно-кишечного тракта и печени серотонина в условиях дизентерийной интоксикации. 5, 617.
- Ширинян Э. А., Авакян О. М. Влияние адреналэктомии и химической симпатэктомии на содержание катехоламинов в центральной нервной системе при геморрагическом стрессе. 2, 216.
- Шеколдина Т. Г., Ватолкина О. Е., Либинзон Р. Е. Влияние психотропных препаратов на активность фосфолиэстеразы цАМФ коры головного мозга крысы. 2, 166.
- Юсипова Н. А. Гидролитические ферменты биологических жидкостей и скелетной мышцы белых крыс с адыовантным артритом. 3, 362.

Методы биохимических исследований

- Бабарыкин Д. А., Валинивец М. Ю., Бауман В. К. Количественное определение кальций-связывающего белка методом радиальной иммунодиффузии. 6, 847.
- Веревкина И. В., Курилова И. И. Спектрофотометрический метод определения активности моноаминноксидазы в тромбоцитах человека. 1, 137.

- Годлевская М. А., Крегерс А. Ф., Пуриня Б. А., Слущкий Л. И. Применение дисперсионного анализа к изучению биохимического состава стенок магистральных артерий головы и мозговых артерий человека. 5, 712.
- Горбачевская Л. В. Метод измерения констант связывания и количества специфических участков рецепции цАМФ в экстрактах ткани. 3, 423.
- 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. 5, 702.
- Замараева Т. В., Инсарова И. Д., Мазуров В. И. Получение радиоактивного коллагенового субстрата из сухожилий куриных эмбрионов для определения активности коллагеназ животного происхождения. 3, 419.
- Кисурин М. И., Архипова Г. Ф., Келин Е. П., Микичур Н. И. Использование методов ультрамикрoанализа для определения активности малат- и лактатдегидрогеназы в биоптатах миокарда больных пороками сердца. 6, 851.
- Лебедев Д. А. Метод изучения обмена коллагена в коже человека. 5, 708.
- Ченуша В. П., Воронка Г. Ш. Метод определения железа и железосвязывающей способности сыворотки крови без осаждения белков у детей раннего возраста. 3, 415.
- Шурда Г. Г., Панин Л. Е. Об определении изоферментов гексокиназы в различных тканях. 2, 282.

Рецензия

- Ашмарин И. А., Рецензия на книгу Ф. И. Комарова, Б. Ф. Коровкина, В. В. Меньшикова. Биохимические исследования в клинике. М., «Медицина», 1976, 1, 141.
- Мазуров В. И. Рецензия на книгу «Biochemistry of Collagen» Ed. G. N. Ramachandran, A. H. Reddi New York — London, Plenum Press, 1976, 536 p. 3, 427.
- Слущкий Л. И. Рецензия на книгу В. П. Торбенко, Б. С. Касавиной «Функциональная биохимия костной ткани». М., «Медицина», 1977, 272 с. 4, 572.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----|
| Козлов Е. А., Петрий О. П. Имобилизованная аспаргиназа и ее использование в медицине . . . | 723 |
| Бодиев Р.-Д. Д., Чиркина Т. Ф. Обнаружение противотканевых антител в сыворотке крови крыс при введении нитритов . . . | 733 |
| Проценко В. А., Богдельников И. В., Спицын И. Ф. Антипротеазная активность сыворотки крови при парентеральном введении протеолитических ферментов, гистамина и ацетилхолина . . . | 736 |
| Алматов К. Т., Рахимов М. М. Функционирование митохондрий печени крыс при гепатите . . . | 740 |
| Фролькис Р. А., Гунина Л. М. Изменения калликреин-кининовой системы крови в процессе развития экспериментального инфаркта миокарда . . . | 747 |
| Хохлов А. П., Малаховский В. К. Особенности обмена циклического 3',5'-АМФ у больных прогрессирующими мышечными дистрофиями . . . | 754 |
| Певзнер Д. Л., Балашова Е. К., Круглова Э. Э., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е., Абдувахобов А. А. Внутриклеточное распределение фосфорорганических ингибиторов холинэстеразы в мозге крыс . . . | 758 |
| Подвигина Т. Т., Трошихин Г. В. Влияние гипероксии в сочетании с введением гидрокортизона на дыхание митохондрий мозга крыс . . . | 762 |
| Антипенко А. Е., Бубеев Ю. А., Коровкин Б. Ф., Михалева Н. П. Система цАМФ в мышечной ткани при длительной гипокинезии . . . | 765 |
| Симхович Б. З. Активность аденилциклазы в клетках асцитной карциномы Эрлиха in vitro . . . | 768 |
| Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Камиллов Ф. Х., Якушев В. С. Нарушения энергетического метаболизма печени при эмоционально-болевым стрессе и предупреждение этих нарушений гамма-оксипутиратом натрия . . . | 774 |
| Блеян Г. Т., Погосян А. С., Степанян М. А., Осипова Э. Н. Роль кининовой системы . . . | |

CONTENTS

| | |
|--|-----|
| Kozlov, E. A., Petryi, O. P.: Immobilized Asparaginase and Its Use in Medicine . . . | 723 |
| Bodiev, R. D., Chirkina, T. F.: Detection of Antitissue Antibodies in Rat Blood Serum in Administration of Nitrites . . . | 733 |
| Protsenko, V. A., Bogadel'nikov, I. V., Spitsin, I. F.: The Antiprotease Activity of Blood Serum in Parenteral Administration of Proteolytic Enzymes, Histamine and Acetylcholine . . . | 736 |
| Almatov, K. T., Rakhi-mov, M. M.: Function of Rat Liver Mitochondria in Hepatitis . . . | 740 |
| Frol'kis, R. A., Gunina, L. M.: Alterations in Blood Kallikrein-Kinine System in Dynamics of Experimental Myocardial Infarction . . . | 747 |
| Khokhlov, A. P., Malakhov-sky, V. K.: Characteristics of Cyclic 3',5'-AMP Turnover in Patients with Progressive Muscular Atrophy . . . | 754 |
| Pevzner, D. L., Balasho-va, E. K., Kruglova, E. E., Rozengart, V. I., Shersto-bitov, O. E., Abd uvakhobov, A. A.: Intracellular Distribution of Organophosphorous Inhibitors of Cholinesterase in Rat Brain . . . | 758 |
| Podvigina, T. T., Troshikhin, G. V.: Simultaneous Effect of Hyperoxia and Hydrocortisone Administration on Mitochondrial Respiration in Rat Brain . . . | 762 |
| Antipenko, A. E., Bubeev, Yu. A., Korovkin, B. F., Mikhaleva, N. P.: cAMP System in Muscular Tissue in Prolonged Hypokinesia . . . | 765 |
| Simkhovich, B. Z.: Adenylate Cyclase Activity in Cells of Ehrlich Ascites Carcinoma in vitro . . . | 768 |
| Meerson, F. Z., Pavlova, V. I., Kamilov, F. Kh., Yakushev, V. S.: Impairment of Energy Metabolism in Liver Tissue under Conditions of Stress Caused by Pain and Emotion and Prevention of the Impairments by Treatment with Sodium γ -Hydroxybutyrate . . . | 774 |
| Bleyan, G. T., Pogosyan, A. S., Stepanyan, M. A., Osipova, E. N.: The Role of Blood Kinine . . . | |

- крови в патогенезе геморрагического синдрома при геморрагическом васкулите
- Фесенко В. П., Бабалич А. К. Некоторые показатели кининовой системы при заболеваниях щитовидной железы 779
- Огородникова Л. Г. Влияние ишемии мозга на содержание гликогена в печени и мышцах 781
- Лебедев Д. А. Обмен коллагена при системной склеродермии 786
- Деев А. И., Еремина Т. В., Спиричев В. Б. Влияние ретинола на перекисное окисление в фосфолипидных мембранах 789
- Плетень А. П., Мазо В. К., Никуличева С. И., Шатерников В. А. Выделение и очистка ангиотензиногена из плазмы крови свиней и овец 795
- Атаханова Б. А., Туракулов Я. Х., Ташмухамедова М., Шеталова М. В. Биосинтез белков в бесклеточной белоксинтезирующей системе из клеток рака щитовидной железы 798
- Чаяло П. П. Характер изменения некоторых показателей обмена липидов в печени на ранних стадиях экспериментального атеросклероза в связи с возрастом 802
- Погосова А. В., Петухова Л. М., Никулин И. В., Коникова А. С. Значение постмортального охлаждения для восстановления метаболизма при оживлении 806
- Иванов В. В., Кузнецова Г. П., Арчаков А. И. Стимуляция акрилонитрилом перекисного окисления липидов в печени крыс 811
- Балаба Т. Я., Фурцева Л. Н., Шинкаренко И. Н., Абдуразаков У. А. Обмен коллагена при контрактуре Дюпюитрена 816
- Лашак Л. К., Требухина Р. В., Островский Ю. М. Превращения глюкозо-6-фосфата в тканях животных, получающих высокие дозы окситиамина или тиамина 818
- Косик О. Г., Троицкий Г. В., Павлюк В. Н., Галахин К. Д., Тоскина М. К. Физико-химические свойства иммуноглобулина G из сыворотки крови тиреоидэктомизированных кроликов 822
- Фицнер А. Б. Обмен L-альбидина в срезах печени крыс 827
- Поликарпова Л. И., Резник С. Э., Рыженков В. В., Хечиашвили Г. Г., Петрова Л. А., Мухина Н. И., Безрукова О. А. Гиполипидемическая активность веществ, структурно близких пенфенону, у крыс и мышей 832
- Головенко Н. Я., Карасева Т. Л., Курушин А. А. System in Pathogenesis of Hemorrhagic Syndrome in Hemorrhagic Vasculitisi 836
- Fesenko, V. P., Babalich, A. K.: Some Patterns of Kinine System in Impairments of Thyroid Gland
- Ogorodnikova, L. G.: Effect of Brain Ischemia on Content of Glycogen in Liver and Muscle Tissues
- Lebedev, D. A.: Metabolism of Collagen in Systemic Sclerodermia
- Deev, A. I., Eremina, G. V., Spirichev, V. B.: Effect of Retinol on Peroxidative Oxidation in Phospholipid Membranes
- Pleten, A. P., Mazo, V. K., Nikulichева, S. I., Shaternikov, V. A.: Isolation and Purification of Angiotensinogen from Pig and Sheep Blood Plasma
- Atakhanova, B. A., Turakulov, Yu. Kh., Tashmukhamedova, M., Shetalova, M. V.: Biosynthesis of Proteins in Cell-Free Synthesizing System from Cells of Struma Maligna
- Chayalo, P. P.: On the Alteration in Some Patterns of Lipid Metabolism in Liver Tissue at Early Steps of Experimental Atherosclerosis, Depending on Age
- Pogosova, A. V., Petukhova, L. M., Nikulin, V. I., Konnikova, A. S.: The Importance of Postmortal Hypothermia for Restoration of Metabolism in Reanimation
- Ivanov, V. V., Kuznetsova, G. P., Archakov, A. I.: Stimulation of Lipid Peroxidation by Acrylonitrile in Rat Liver Tissue
- Balaba, T. Ya., Furtseva, L. N., Shinkarenko, I. N.: Abdurazakov, U. A.: Collagen Metabolism in Dupuytren's Contracture
- Leshak, L. K., Terbukhina, R. V., Ostrovsky, Yu. M.: Transformations of Glucose-6-Phosphate in Mammalian Tissues after Treatment with High Doses of Hydroxythiamin or Thiamin
- Kosik, O. G., Troitsky, G. V., Pavlyuk, V. G., Galakhin, K. D., Toskina, M. K.: Physico-Chemical Properties of Immunoglobulin from Blood Serum of Thuroidectomized Rabbits
- Fitzner, A. B.: On the Metabolism of L-Albizzin by Rat Liver Slices
- Polykarpova, L. I., Reznik, S. E., Ryzhenkov, V. E., Khechinashvili, G. G., Petrova, L. A., Mukhina, N. I., Bezrukova, O. A.: Hypolipidemic Activity of Substances, Structurally Resembling Penphenone, in Rats and Mice
- Golovenko, N. Ya., Karaseva, T. L., Kurushin, A. A.:

| | | |
|--|-----|--|
| Ацетилирование 7-аминопроизводного нитразепама субклеточными фракциями некоторых органов и кровью белых крыс | 839 | Acetylation of 7-Aminoderivative of Nitrazepam by Subcellular Fractions of Some Tissues and Blood of Rats |
| Х у р с и н Н. Е. Обнаружение и возможная роль ДНК-аз в секрете слезных желез человека | 845 | Khursin, N. E.: Detection of DNAases in Secretion of Human Lacrimal Glands and Their Possible Role |
| Методы биохимических исследований | | Methods of Biochemical Investigations |
| Б а б а р ы к и н Д. А., В а л и н и е ц е М. Ю., Б а у м а н В. К. Количественное определение кальций связывающего белка методом радиальной иммунодиффузии | 847 | Babarykin, D. A., Valinietse, M. Yu., Bauman, V. K.: Quantitative Estimation of Ca ²⁺ -Binding Protein Using Radial Immunodiffusion |
| К и с у р и н а М. И., А р х и п о в а Г. Ф., К е л и н Е. П., М и к и ч у р Н. И. Использование методов ультрамикрoанализа для определения активности малат- и лактатдегидрогеназы в биоптатах миокарда больных пороками сердца | 851 | Kisurina, M. I., Arkhipova, G. F., Kelin, E. P., Mikhichur, N. I.: Use of Ultramicroanalytic Methods for Estimation of Activities of Lactate- and Malate Dehydrogenases in Biopsy from Myocardium of Patients with Heart Disease |
| Указатель статей за 1978 г. | 855 | Index of the Articles Published in the Journal during 1978 |

Техн. редактор Л. В. Зюкина

Корректор Л. Г. Воронина

Сдано в набор 18/IX 1978 г. Подписано к печати 27/X 1978 г. Формат бумаги 70×108¹/₁₆.
печ. л. 9 (условных 12,60 л.) уч.-изд. л. 14,02 Тираж 2045 экз. Заказ 2240

Издательство «Медицина». Москва, Петроверигский пер. 6/8
Чеховский полиграфический комбинат Союзполиграфпрома
Государственного комитета СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области