

И. Д. Инсарова, Т. В. Замараева, В. И. Мазуров

КОЛЛАГЕНАЗЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В течение длительного времени процесс распада коллагеновых белков и волокон в соединительной ткани служил предметом дискуссий. Предполагалось, что обмен коллагена в тканях происходит чрезвычайно медленно и осуществляется неспецифическими протеиназами. Однако впоследствии появилось много данных, свидетельствующих о высокой скорости распада и биосинтеза коллагена во время различных процессов, таких, как перестройка тканей при метаморфозе у головастика, инволюция матки после родов, резорбция и перестройка костной ткани, регенерация, репаративные процессы и др.

Молекула коллагена представляет собой единую спиральную структуру, состоящую из 3 полипептидных α -цепей, стабилизированную водородными, электростатическими и ковалентными связями. Концевые участки молекулы коллагена отличаются от основной спиральной части, являясь почти глобулярными. Протеиназы (трипсин, химотрипсин, пепсин, проназа), ограниченно расщепляя концевые участки, не затрагивают спиральной области нативной молекулы коллагена, но способны гидролизовать денатурированный коллаген. Однако в организме практически не бывает условий для денатурации коллагена, за исключением, может быть, раневых поверхностей, где происходит закисление тканей, и измененных участков при язве желудка. Поэтому для поисков фермента, осуществляющего распад коллагена в тканях животных при физиологических рН и температуре, необходимо использовать в качестве субстрата нативный коллаген.

Первые данные о наличии истинной коллагенолитической активности в тканях животных получили Гросс и Ланиер [1], которые применили технику культивирования эксплантата ткани хвоста головастика на стадии метаморфоза на структурированных гелях нативного коллагена. Установлено, что ткань, культивируемая при 37°C и рН 7,4—8,0, лизирует коллагеновые пленки, причем размер зоны лизиса находится в прямой зависимости как от времени инкубации, так и от размера исследуемого тканевого эксплантата. Структурированные гели не лизируются в этих условиях протеолитическими ферментами, и исследуемый фермент секретировается в культуральную среду неповрежденными клетками, а не накапливается в результате распада ткани.

Эти работы положили начало дальнейшим исследованиям коллагеназ в различных тканях животных. Уже накоплен огромный экспериментальный материал, касающийся разных форм коллагеназ, механизма их действия, свойств и др. [2, 3]. В настоящем обзоре сделана попытка проанализировать современное состояние вопроса, связанного с изучением коллагеназ тканей животных.

Методы определения активности, выделения и очистки коллагеназ

Методы определения активности коллагеназ. Коллагенолитическая активность коллагеназ животного происхождения оценивается по изме-

пению физико-химических свойств нативного коллагена или появлению продуктов его расщепления.

Вискозиметрия. Вискозиметрический метод основан на определении изменения вязкости растворов нативного коллагена при расщеплении его коллагеназой. Вязкость исследуют при 20—26°C с использованием растворов, содержащих исследуемую коллагеназу, и в качестве субстрата — кислоторастворимый коллаген, получаемый, как правило, из кожи крыс или морских свинок [4—6]. Для определения коллагеназной активности методом вискозиметрии при 37°C к реакционной смеси добавляют аргинин, препятствующий образованию фибрилл [7].

Определение коллагенолитической активности с использованием структурированных гелей радиоактивного коллагена. Метод основан на освобождении в присутствии коллагеназы радиоактивных пептидов из структурированных гелей, образующихся в растворах высокоочищенных препаратов коллагена при 37°C и нейтральном pH. Исследуемую ткань или препараты коллагеназы инкубируют со структурированными гелями коллагена различное время, затем пробы центрифугируют и определяют радиоактивность пептидов в надосадочной жидкости. Контролем на нативность субстрата служат пробы, инкубированные в тех же условиях с трипсином [8].

Исследование активности коллагеназы с использованием растворов радиоактивного коллагена. Для определения коллагенолитической активности можно использовать не структурированные гели, а раствор меченого коллагена. В этом случае реакцию проводят при 20—25°C в среде, содержащей ионы кальция, и по окончании инкубации реакцию останавливают добавлением ЭДТА. Дальнейшая обработка проб и идентификация продуктов протеолиза возможны несколькими способами. Например, можно осадить нерасщепленный коллаген добавлением смеси фосфовольфрамовой и соляной кислот [9]. В другом случае осаждение нерасщепившихся молекул достигается перенесением проб в термостат для формирования фибрилл при 37°C [10]. В обоих случаях активность коллагеназы оценивают после центрифугирования проб по радиоактивности пептидов в надосадочной жидкости. Уэри и Бурлей [8] выявляли продукты коллагенолитического расщепления с помощью диск-электрофореза после проведения ферментной реакции при 24°C.

Определение активности коллагеназы в растворе возможно и при 37°C, однако для предупреждения образования фибрилл в этих условиях к реакционной смеси добавляют глюкозу. После остановки реакции 10^{-2} М ЭДТА продукты расщепления коллагена экстрагируют диоксаном и измеряют их радиоактивность [11].

Выделение и очистка коллагеназ. Обычно исходным материалом для выделения коллагеназы служит среда, в которой в течение определенного срока культивируют ткань или клетки. Таким методом из культуральной среды была выделена, частично очищена и охарактеризована коллагеназа кожи [4, 12, 13], костной ткани [6, 14], матки [15, 16], синовиальной ткани больных ревматоидным артритом [17, 18] и др. Коллагенолитическая активность обнаруживается в среде и при культивировании клеток — фибробластов или макрофагов из различных источников [8, 19—23].

Как правило, максимальная активность наблюдается в среднем на 4—6-й день культивирования [8, 14, 18, 24]. Однако выход фермента в среду по дням культивирования может несколько различаться в зависимости от источника ткани, поэтому для препаративного получения коллагеназы необходимо в каждом случае определение сроков максимального выхода ферментного белка.

Попытки обнаружить коллагенолитическую активность непосредственно в экстрактах из тканей долгое время были безуспешны. Исключение составляли гомогенаты ткани гепатопанкреаса краба [25—27] и гранулоцитов [28, 29], в которых фермент был выявлен без предварительного куль-

тивирования. Считалось, что отсутствие определяемой коллагенолитической активности в экстрактах связано с очень низким содержанием фермента в ткани.

Однако Эйзен и соавт. [30], используя моноспецифическую сыворотку против коллагеназы, очищенной из культуральной среды, установили наличие неактивной формы фермента в коже головастика и человека. Райан и Уоснер также отметили, что при инкубации гомогената матки крыс в присутствии ионов Са в надосадочной жидкости появляются оксипролин-содержащие пептиды [31]. Выход этих пептидов в надосадочную жидкость может быть предупрежден торможением коллагеназы 10^{-3} М ЭДТА или цистеином. Эти данные свидетельствуют о том, что ткань содержит фермент, расщепляющий нативный коллаген, активность которого в экстрактах, однако, не удастся определить биохимическими методами. Действительно, в первом из описанных выше случаев [30] авторы показали, что коллагеназа в ткани находится в комплексе с ингибитором и получение активного препарата возможно после разделения комплекса при гель-фильтрации.

По мнению Уикса и соавт. [32], коллагеназа в ткани матки прочно связана с нерастворимыми фибриллами коллагена и поэтому не обнаруживается в солевых экстрактах. Возможность образования комплекса коллагеназы с субстратом была показана в опытах Нагаи [33], который установил, что 80% меченой ^{14}C коллагеназы головастика связывается с нерастворимыми фибриллами коллагена.

В настоящее время разработан ряд методов экстракции фермента из различных тканей животных с помощью нейтральных солевых растворов [34, 35], тритона [36], бутанола [27, 37] или после температурной обработки ткани [32, 38]. Например, разрушение комплекса коллагеназы с нерастворимым субстратом Уикс [32] проводит нагреванием гомогената матки при 60°C в течение 4—5 мин и затем экстрагирует фермент тритоном. Освобождение активной коллагеназы из комплекса с субстратом в гомогенатах кожи может происходить и при 2-часовой инкубации ткани при 42 — 45°C [38].

По данным Сакамото и соавт. [34], коллагеназа костной ткани куриных эмбрионов очень прочно связана с субстратом и органическим матриксом кости, поэтому она не может быть экстрагирована без предварительной деминерализации ткани. Однако после деминерализации при переведении в раствор высокой ионной силы коллагеназа вновь ассоциирует с коллагеном, который тоже солибилизируется в этих условиях.

В настоящее время охарактеризованы коллагеназы, непосредственно полученные из экстрактов кожи [30, 38], кости [34, 36], костных клеток [39], матки после родов [31, 32, 35, 40, 41], опухолей [7, 37]. Следует отметить, что свойства коллагеназ, полученных из экстрактов ткани, практически не отличаются от свойств фермента, выделенного из культуральной среды.

Для получения очищенных препаратов коллагеназы из культуральной среды или экстрактов обычно применяют комбинации стандартных методов очистки ферментов: высаливание сульфатом аммония, гель-фильтрацию, ионообменную и аффинную хроматографию. Впервые аффинная хроматография была использована для очистки животной коллагеназы Бауером и соавт. [42]. Принцип метода заключается в том, что коллагеназа, обладающая высоким сродством к субстрату, может специфически сорбироваться на коллагене, иммобилизованном на нерастворимой матрице — сефарозе. С помощью этого метода были получены гомогенные, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, коллагеназы из кожи человека [42] и морских свинок [4], синовиальных оболочек больных ревматоидным артритом [43], фибробластов, полученных из той же ткани [23], а также ткани головастика [44].

Мак Кроскери и соавт. [45], используя в качестве лиганда коллагеновый пептид СВ-7, образующийся при расщеплении молекулы коллагена бромцианом, выделили чистый препарат коллагеназы из асцитной карциномы V₂ кролика.

Кроме коллаген-сефарозы, для афинной хроматографии может быть использована гепарин-сефароза, так как фермент образует стабильный ком-

Т а б л и ц а 1

Очистка коллагеназы опухоли кролика

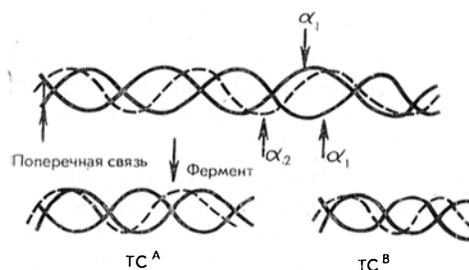
Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Тканевой экстракт	31 869	438	0,013	1	100
20—50% насыщения сульфатом аммония	5 100	4 370	0,83	65	1 000
ДЭАЭ-сефадекс А-50	1 062	7 550	7,15	533	1 720
Биогель А-1,5 м	7,14	5 270	738	55 500	1 200
Агароза- α 1СВ7	0,83	2 960	3 570	268 780	670

Примечание. 1 ед. — 1 мкг коллагеновых фибрилл, расщепленных за 1 мин при 35—37°C.

плекс с гепарином при низкой ионной силе [46]. На табл. 1 представлена схема очистки коллагеназы из гомогенатов ткани асцитной карциномы V₂ кролика [45]. Резкое увеличение общей активности фермента после фракционирования сульфатом аммония авторы работы объясняют удалением на этой стадии большей части ингибитора коллагеназы.

Свойства коллагеназ животного происхождения

В отличие от бактериальных коллагеназ, катализирующих разрыв примерно 200 связей на молекулу коллагена, коллагеназы животного происхождения расщепляют молекулу нативного коллагена на 2 фрагмента.



TC^A - и TC^B -фрагменты молекулы коллагена, образующиеся при действии коллагеназы [48]

Фермент гидролизует одновременно 3 α -цепи молекулы, не нарушая спиральности образующихся фрагментов. Сохранение спиральности полученных пептидов подтверждается данными о том, что инкубация коллагена с коллагеназой сопровождается падением вязкости раствора при сохранении величины дисперсии оптического вращения [47]. При сравнении размеров SLS-агрегатов, образованных интактными и расщепленными молекулами коллагена, установлено [48], что коллагеназы тканей животных расщепляют молекулу коллагена на TC^A- и TC^B-фрагменты, длина которых составляет $\frac{3}{4}$ и $\frac{1}{4}$ от первоначального размера молекулы, считая от NH₂-конца (см. рисунок).

Как видно из табл. 2, молекулярная масса исследованных коллагеназ варьирует, по данным различных авторов, от 32 000 до 165 000. Это, возможно, объясняется существованием различных форм фермента. Например, обнаружено, что коллагеназа из гранулоцитов состоит из 2 субъединиц с

молекулярной массой 42 000 и 33 000 [49]. Коллагеназа из альвеолярных макрофагов была выделена в 3 активных формах, переходящих одна в другую при изменении ионной силы раствора [50]. Обнаружение в коже морских свинок 2 коллагеназ с молекулярной массой 40 000 и 130 000, по-видимому, объясняется тем, что они продуцируются различными участками кожи — дермой и эпителием [4].

Оптimum действия коллагеназ находится при нейтрально-слабощелочных значениях рН, и для проявления коллагенолитической активности

Т а б л и ц а 2

Молекулярная масса коллагеназ животного происхождения

Источник	Ткань, клетки, орган	Молекулярная масса	Ссылка на работу
Человек	Кожа	63 000	51
	Фибробласты кожи	50 000 и 45 000 (2 формы)	52
	Десны	39 000—41 000	53
	Синовиальная жидкость	32 000	51
	Синовиальные оболочки	33 000	43
	Гранулоциты	76 000 (субъединицы: 42 000 и 33 000)	49
Кролик	Асцитная карцинома V ₂	33 000—35 000	45
	Альвеолярные макрофаги	45 000, 85 000 и 165 000 (3 формы)	50
	Конъюнктивa глаза	65 000	12
	Фибробласты синовиальной оболочки	32 000—35 000	23
Мышь	Кость	41 000	14
Крыса	Матка	66 000	54
Морская свинка	Кожа	40 000 и 130 000 (2 формы)	4
Головастик	Плавник хвоста	104 000	44
	Кожа	40 000—43 000	55

необходимо присутствие в среде ионов Са. Сильными ингибиторами коллагеназ животного происхождения являются ЭДТА и другие хелатные агенты, связывающие кальций. Активность этих ферментов снижается также в присутствии ряда восстановителей SH-групп [8, 21], при образовании комплекса с некоторыми белками сыворотки. Диизопропилфторфосфат, соевый ингибитор трипсина и ряд других специфических ингибиторов протеиназ не влияют на активность коллагеназы [8, 21]. Исключение составляет выделенный из гепатопанкреаса краба фермент, активность которого не ингибируется ЭДТА и цистеином, но тормозится диизопропилфторфосфатом и ингибиторами трипсина [25, 27].

С у б с т р а т н а я с п е ц и ф и ч н о с т ь к о л л а г е н а з

Коллагеназы животного происхождения являются ферментами, обладающими узкой субстратной специфичностью. Как уже отмечалось, коллагеназа — единственный фермент, расщепляющий спиральную область нативной молекулы коллагена. Денатурированный коллаген — также субстрат фермента, хотя утрата вторичной и третичной структуры, по-видимому, нарушает оптимальные условия взаимодействия фермента с субстратом. Это подтверждается изучением скоростей гидролиза нативного и денатурированного коллагена в идентичных условиях. Установлено, что фермент из асцитной карциномы V₂ в 12 раз быстрее расщепляет нативный коллаген, чем денатурированный [7, 45]. Аналогичные результаты получены при исследовании коллагеназы из синовиальных оболочек больных ревматоидным артритом [56].

Как известно, нативный коллаген может существовать в различных формах: в мономерной форме в растворе, в виде структурированных гелей и в виде фибрилл (нерастворимый коллаген). Использование этих форм коллагена в качестве субстрата для коллагеназы выявило различную устойчивость их к энзиматической деградации. В ряде работ обнаружено, что растворимый коллаген расщепляется ферментом с большей скоростью, чем структурированные гели [18, 57, 58]. В свою очередь последние гидролизуются быстрее нерастворимого коллагена, что было выявлено при сравнении скоростей освобождения оксипролинсодержащих пептидов из обеих форм коллагена при действии коллагеназы синовиальной ткани [43]. Различная скорость расщепления структурированных гелей и нативных фибрилл объясняется тем, что наличие в составе фибрилл коллагена протеогликанов и мукополисахаридов, а также большое число поперечных межмолекулярных связей стабилизируют молекулу коллагена — например, увеличивают ее устойчивость к термической денатурации и энзиматическому расщеплению [59, 60]. В растворе же молекулы коллагена находятся в мономерном состоянии, что делает их стерически более доступными для фермента и обеспечивает достаточно высокую скорость ферментативного гидролиза.

В настоящее время большое внимание исследователей привлекает проблема специфичности коллагеназ животного происхождения в отношении различных типов коллагена. Так, установлено [21, 45, 61], что высокоочищенные препараты коллагеназ из макрофагов, фибробластов легочной ткани человека и асцитной карциномы кроликов гидролизуют коллаген I и III типов практически с одинаковой скоростью. Однако фермент, полученный из полиморфноядерных лейкоцитов человека, в 15 раз более эффективно расщепляет коллаген типа I, чем коллаген типа III [61]. Робертсон и Миллер [62] обнаружили, что коллагеназа из десен и полиморфноядерных лейкоцитов за 4 ч расщепляет примерно на 30 % коллаген кожи и кости (коллаген типа I) и почти не гидролизует коллаген хрящевой ткани (коллаген типа II). Сравнение расщепления коллагенов типов I, II и III коллагеназами из различных источников — кожи [63], синовиальной ткани [64], асцитной карциномы [45], макрофагов [21] — показало, что гидролиз коллагена типа II происходит значительно медленнее (в 5—6 раз), чем коллагена типов I и III. Однако в доступной нам литературе мы не нашли данных о свойствах коллагеназы хрящевой ткани и нельзя исключить, что субстратная специфичность этого фермента окажется более узкой в отношении хрящевого коллагена.

Важным моментом изучения механизма действия тканевых коллагеназ являются исследования, касающиеся изучения природы и локализации гидролизуемой связи. Нагаи и соавт. [65] показали, что при расщеплении трехспиральной молекулы коллагена типа I коллагеназой из хвоста головоастика на карбоксильном конце ТС^A-фрагмента во всех 3 α -цепях содержится остаток глицина. На NH₂-конце ТС^B-фрагмента одна α -цепь содержит остаток лейцина, а две другие — остаток изолейцина. Позднее изучено действие высокоочищенных коллагеназ из хвоста головоастика и асцитной карциномы V₂ на молекулу коллагена типа I и отдельно на α_1 - и α_2 -цепи. Оказалось, что оба фермента гидролизуют α_1 -цепь по связи гли-иле, локализованной в СВ7-пептиде (пептиды, образующиеся при действии на α -цепи V₂CN), а α_2 -цепь — по связи гли-лей, локализованной в том же участке СВ7-пептида. Связь гли-иле, имеющаяся в СВ8-пептиде, не подвергается коллагенолитическому расщеплению [45, 66]. Высокоочищенный фермент из карциномы V₂ [67] гидролизует коллаген типов II и III в том же участке — между 772-м и 773-м аминокислотными остатками, причем в коллагене типа II расщепляются связи гли-иле, а в коллагене типа III — гли-лей. Для всех 4 цепей молекулы коллагенов различных типов — α_1 (I), α_1 (II), α_1 (III) и α_2 характерно, как видно из приводимой схемы, наличие по соседству с расщепляемой связью гли-иле (лей) остатка аланина:

α 1 (I)^B-гли-иле-ала-гли-гли-арг-гли-вал-вал-гли- цыпленок

α 1 (II)^B-гли-иле-ала-гли-гли-арг-гли-лей-вал-гли- человек

α 1 (III)^B-гли-лей-ала-гли-лей-арг-гли-ала-арг-гли- человек

α 2^B-гли-лей-ала-гли- цыпленок

Однако такая аминокислотная последовательность имеется еще в 2 участках молекулы коллагена, которые не подвергаются энзиматическому гидролизу. Миллер и соавт. [67] полагают, что участок узнавания коллагеназой молекул субстрата включает в себя по крайней мере 5 аминокислотных остатков с СООН-конца от расщепляемой связи.

Таким образом, анализ первичной структуры 4 α -цепей коллагена в участке молекулы, подвергающемся коллагенолитическому расщеплению, не позволяет сделать заключение о причине более медленного гидролиза коллагена типа II по сравнению с коллагенами типов I и III.

Регуляция активности коллагеназы

Ингибиторы ферментативной активности. Тормозящее действие ЭДТА и других хелатных агентов, а также цистеина и сыворотки крови установлено при исследовании всех известных коллагеназ животного происхождения. Следует, однако, заметить, что в зависимости от источника выделения ферменты проявляют различную чувствительность к ингибиторам в отношении их концентраций. Кроме того, тормозящее воздействие одного и того же ингибитора на активность некоторых коллагеназ может быть обратимо при изменении условий, тогда как ингибирование активности других коллагеназ этим же агентом носит необратимый характер.

Примером может служить коллагеназа головастики и матки крыс. Активность первой полностью тормозится 10^{-3} М ЭДТА и может быть восстановлена после диализа или добавления избытка ионов кальция [24], а активность коллагеназы матки крыс тормозится 10^{-2} М ЭДТА необратимо [32].

Интересно также сопоставить действие цистеина на коллагеназы. Цистеин, восстанавливающий дисульфидные связи, необратимо тормозит активность коллагеназы головастика в концентрации 10^{-3} М [24, 50] и практически не влияет на фермент из матки крыс даже в более высокой (10^{-2} М) концентрации [15, 32]. Активность коллагеназы из кожи крыс полностью ингибируется 10^{-1} М цистеином и не тормозится цистеином в концентрации 10^{-3} М [13].

Сильное ингибирующее воздействие практически на все изученные до сих пор коллагеназы животного происхождения, за исключением коллагеназы полиморфноядерных лейкоцитов [28], оказывает сыворотка крови. Впервые это было установлено еще в 1968 г. при исследовании коллагеназ кожи человека [68] и синовиальной ткани больных ревматоидным артритом [18]. Уже тогда высказано предположение, что коллагенолитическая активность может частично контролироваться отдельными компонентами сыворотки. В дальнейшем при изучении действия различных компонентов сыворотки на активность коллагеназы обнаружено, что тормозящее действие на активность фермента оказывают фракции α -глобулинов [69]. В других работах, посвященных этому вопросу, установлено, что активность коллагеназ из кожи человека и головастика [30, 69], синовиальной ткани и жидкости больных ревматоидным артритом [70—72], костной ткани [73] и из других источников [10, 21, 45] ингибируется α_1 -антитрипсином и α_2 -макроглобулином.

Отмечено, что коллагеназы животных тканей образуют с α_2 -макроглобулином энзиматически неактивный комплекс, который диссоциирует в присутствии 3 М тиоционата с избирательной денатурацией α_2 -макроглобулина и освобождением активного фермента [70, 74].

Биркедал-Хансен и соавт. [20] использовали другой способ разделения комплекса фермент — ингибитор — инкубацию его с избытком трипсина, имеющего большое сродство к α_2 -макроглобулину. Гель-фильтрация после такой обработки позволяет получить белковую фракцию, содержащую активную коллагеназу. Авторы предполагают, что в таком случае происходит вытеснение одной протеиназы (коллагеназы) другой (трипсином) из контактного центра ингибитора. При этом подчеркивается, что освобождение коллагенолитической активности из комплекса с ингибитором с помощью трипсина отличается от процесса активации трипсином профермента. Активация дает количественно воспроизводимые результаты и требует малых количеств трипсина, а разрушение комплекса, наоборот, количественно невоспроизводимо и нуждается в относительно высоких концентрациях трипсина.

Обнаружение энзиматически неактивных комплексов α_2 -макроглобулина с коллагеназами из различных источников позволяет предположить, что этот сывороточный белок является одним из физиологически важных агентов, регулирующих коллагенолитическую активность *in vivo*.

В сыворотке крови животных и человека обнаружена еще одна белковая фракция, оказывающая ингибирующее действие на активность коллагеназы. Первоначально предполагалось, что ингибитором последней является α_1 -антитрипсин [30, 69]. Однако позднее установлено, что очищенные препараты α_1 -антитрипсина не влияют на скорость расщепления нативного коллагена, хотя ингибируют активность трипсина [70, 73, 75, 76]. Булли и соавт. [77] разделили с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе 2 белка близкой молекулярной массы (около 40 000), один из которых (α_1 -антитрипсин) тормозил активность трипсина, но не оказывал тормозящего действия на активность коллагеназы, а другой, не влияя на трипсин и папаин, являлся сильным ингибитором коллагеназы. Эти авторы назвали указанный белок β -антиколлагеназой. По-видимому, первоначальные данные о тормозящем действии на коллагеназную активность α_1 -антитрипсина объясняются загрязнением его препаратов истинным ингибитором коллагеназы [77—79]. Можно предположить, что β -антиколлагеназа является более специфическим ингибитором коллагенолитической активности, чем α_2 -макроглобулин, который, как известно, тормозит активность ряда протеиназ.

В настоящее время очень мало изучены тканевые ингибиторы коллагеназ. Установлено наличие ингибитора в культуральной среде при культивировании фибробластов кожи человека [19] и в гомогенате асцитной карциномы V₂ кролика [45]. Оба белка имеют несколько большую молекулярную массу, чем соответствующие коллагеназы, и не тормозят активности трипсина. Селлерс и соавт. [86] обнаружили в культуральной среде первых дней культивирования кости кролика ингибитор с молекулярной массой ~30 000, который блокирует коллагеназу кости, кожи и матки. Фермент — ингибиторный комплекс может быть диссоциирован с помощью 4-аминофенилмеркуриацетата или разрушен инкубацией с трипсином. Тканевые ингибиторы коллагеназ должны, по-видимому, играть значительную роль в регуляции коллагенолитической активности *in vivo*, однако этот вопрос до сих пор не исследован.

Еще один класс белковых ингибиторов коллагеназ — основные белки: лизоцим, протамины и гистоны. Было изучено их действие на коллагеназу костной ткани [81] и установлено, что наиболее сильный ингибирующий эффект свойственен гистонам.

Ряд противовоспалительных лекарственных препаратов, таких, как ацетилсалициловая кислота, фенилбутазон и санокризин, тормозит активность коллагеназы лейкоцитов [82].

Активаторы коллагеназ. Соединения, которые непосредственно оказывают стимулирующее действие на активность коллагеназы, до сих пор не обнаружены. Действие известных активаторов направлено на ускорение

выхода фермента в среду или на повышение доступности субстрата для фермента. Например, добавление колхицина к культуральной среде ревматоидной синовиальной ткани приводит к значительному увеличению выхода коллагеназы в среду [83]. Предполагается, что эффект связан с повышением скорости синтеза коллагеназы синовиальной ткани под действием колхицина. Колхицин и цитохалазин В стимулируют также выход в среду коллагеназы из макрофагов перитонеальной жидкости мышей [84].

Известно, что макрофаги играют важную роль в распаде соединительной ткани, участвуя в фагоцитозе. Стимуляция физиологической деятельности макрофагов приводит к освобождению активной коллагеназы в окружающую среду. Например, при фагоцитировании *in vitro* макрофагами мышей и кроликов частиц латекса [21, 22] или линополисахарида из *E. coli* [85] резко увеличивается секреция коллагеназы.

Гольдхабер [86] показал, что ресорбция кости, вызванная паратиреоидным гормоном, возрастает в присутствии гепарина. Этот процесс сопровождается увеличением выхода в среду коллагеназы [87]. Малые количества гепарина, добавленные к коллагеновым пленкам, на которых культивируется ткань кожи или кости мыши, резко ускоряют лизис коллагена [14]. В дальнейшем было обнаружено, что аналогичное действие оказывают хондроитинсульфат и декстрансульфат — вещества, химически и структурно родственные гепарину [58].

Гепарин, хондроитинсульфат и декстрансульфат не влияют на расщепление коллагена в растворе и повышают ферментативную активность высокоочищенных препаратов коллагеназы из кости мыши только при использовании в качестве субстрата нерастворимого коллагена или коллагена в виде структурированных фибрилл [58]. Сакамото и соавт. [46] объясняют этот феномен тем, что при определенных условиях (низкая ионная сила) гепарин образует комплекс как с коллагеназой, так и с коллагеновыми фибриллами. При этом увеличивается концентрация фермента на поверхности субстрата и в промежутках между фибриллами, что и приводит к возрастанию возможности контакта фермента с субстратом и, следовательно, к увеличению скорости коллагенолитической реакции. При проведении реакции в растворе коллагена создаются условия максимального насыщения коллагеназы субстратом и поэтому связывание гепарина с коллагеназой не приводит к ускорению ферментативного процесса.

Гормональная регуляция активности коллагеназы. Известно, что метаболизм коллагена в ряде тканей находится под гормональным контролем [88]. Например, выявлено влияние паратиреоидного гормона на ресорбцию костной ткани [89, 90], прогестерона на стабилизацию структуры матки в последние сроки беременности [91, 92] и др. Таким образом, гормоны должны принимать активное участие в регуляции активности ферментов, осуществляющих распад коллагеновых фибрилл.

Еще в 1966 г. Нагаи и соавт. [24] показали, что добавление тироксина к культурам тканей головастика, находящихся в состоянии метаморфоза, ведет к ускорению выхода фермента в среду, однако гормон не влияет на ткани, не подверженные метаморфозу.

При изучении действия паратиреоидного гормона на костную ткань мышей выявлено, что этот гормон увеличивает освобождение оксипролинсодержащих пептидов при добавлении к среде, в которой культивировали кости черепа мышей [89]. Введение крысам этого гормона *in vivo* также вызывает повышение коллагенолитической активности в культуре кости [93]. В работе Сакамото и соавт. [90] четко доказана прямая зависимость между количеством добавленного гормона паращитовидной железы, степенью ресорбции кости и количеством (по активности) коллагеназы, освобожденной в среду. Механизм влияния гормона на активность коллагеназы не установлен.

Биссинтез и распад коллагена в матке находятся под контролем стероидных гормонов. После окончания беременности в организме снижается

уровень эстрадиола и прогестерона и резко повышается скорость распада коллагена в матке [91, 92]. Добавление их к культуре ткани матки после родов вызывает торможение секреции коллагеназы. Прогестерон и эстроген также замедляют выход коллагеназы в среду при культивировании макрофагов [94]. Секреция коллагеназы клетками различных тканей тормозится и при действии таких глюкокортикоидов, как кортизон, гидрокортизон и дексаметазон [95, 96].

Активация профермента коллагеназ. Длительное время считали, что синтез коллагеназы в переживающей культуре происходит *de novo* [11], что подтверждалось отсутствием ферментативной активности в экстрактах из тканей и среде при ее культивировании в присутствии пенициллина. Однако в 1971 г. Харпер и соавт. [44] показали, что в ткани коллагеназа синтезируется в виде иммунореактивного, но энзиматически неактивного предшественника, который может быть выделен и активирован. Авторы экстрагировали предшественник коллагеназы из гомогенатов хвоста головастика. Активацию проводили с помощью культуральной среды (из которой предварительно была удалена активная коллагеназа), полученной после 3–4 дней культивирования ткани. Оказалось, что трипсин и химотрипсин не влияли на профермент. Активатором явилась термолabileнная высокоспецифическая протеиназа, под действием которой молекулярная масса профермента уменьшалась на 10 000–15 000. Активированная коллагеназа обладала такими же свойствами, как и активный фермент.

При культивировании ткани хвоста головастика проколлагеназа накапливалась в среде, ее активация начиналась с 3-го дня культивирования, причем с увеличением содержания активной коллагеназы в среде снижалось количество зимогена [97]. Ваес [98] довольно подробно изучил превращение проколлагеназы в активную форму в культуральной среде экстрактатов костной ткани. В первые дни культивирования в среде установлена крайне низкая коллагенолитическая активность, которая повышалась при инкубации среды с трипсином. Химотрипсин тоже активировал профермент, но в 20–40 раз медленнее, чем трипсин.

Для обнаружения активатора проколлагеназы в культуральной среде Ваес [98] инкубировал ткань с различными количествами трипсина, причем экспозиция и концентрация трипсина были недостаточны для активации профермента. Добавление такой «субактивированной» среды к неактивной культуральной среде способствовало превращению зимогена в активную форму. На основании этих данных Ваес [98] предполагает два механизма активации предшественника трипсином: прямое действие на проколлагеназу, приводящее к отщеплению пептида, и опосредованное — через активацию проактиватора предшественника коллагеназы. По свойствам указанный активатор, обнаруженный в культуральной среде, напоминает нейтральные протеиназы, а его молекулярная масса $\sim 100\ 000$ [99].

Активацию профермента можно осуществить также с помощью лизоцима печени [98, 100], калликреина [100, 101] и плазмина [100, 102]. Среди лизосомальных протеиназ активирующее действие на проколлагеназу оказывает катепсин В₁ [100]. Активирующее действие катепсина В₁ максимально при pH 6,0–6,5 и полностью ингибируется 10^{-4} М *n*-хлормеркурибензоатом, 10^{-2} М йод-ацетатом и казеином 5 мг/мл. Активация калликреином и плазмином максимальная при физиологических значениях pH 7,4–7,6 [100]. Ваес и Икхаут [100] полагают, что механизм активации проколлагеназы перечисленными протеиназами и трипсином, по-видимому, идентичен.

Лейкоциты человека при фагоцитозе выделяют в среду большое количество проколлагеназы. Основным источником профермента являются полиморфноядерные лейкоциты, а лимфоциты и лимфоциты содержат его меньше [103]. Секретируемый лейкоцитами зимоген может быть активирован с помощью трипсина или ревматоидной синовиальной жидкости [103, 104]. Позднее из синовиальной жидкости больных ревматоидным

артритом выделен и очищен в 55 раз активатор проколлагеназы с молекулярной массой 35 000. Установлено, что активирующий проколлагеназу фермент стабилен при рН 5,5—8,0, термолабилен и не способен деградировать коллаген. Диизопропилфторфосфат, соевый ингибитор трипсина и дитиотреитол не влияют на эту протеиназу, но ее действие тормозится в присутствии *n*-хлормеркурибензоата и йод-ацетамида. Трипсин и папаин также резко снижают активность активатора [105].

Протеиназа, способная активировать проколлагеназу из десен крупного рогатого скота, фибробластов и макрофагов, обнаружена в гомогенатах тучных клеток [20, 106, 107]. С помощью гель-фильтрации при высокой ионной силе в гомогенате тучных клеток выявлены 3 белковые фракции с молекулярной массой 16 000, 80 000 и 36 000, оказывающие активирующее действие на проколлагеназу. При низкой ионной силе эти протеиназы существуют в виде высокомолекулярного комплекса.

Активация профермента матрицы, присутствующего в ткани в больших количествах в первый день после родов, осуществляется тканевой сериновой протеиназой, активность которой полностью тормозится различными ингибиторами трипсина [54].

Таким образом, активация предшественника коллагеназы может быть достигнута рядом ферментов с различной субстратной специфичностью. Это позволяет предположить, что отщепляемый при активации проколлагеназы пептид содержит несколько связей, чувствительных к действию протеиназ [107], или, как считает Ваес [99], существует одна или много стадий на пути активации этих протеиназ и проколлагеназы. Так или иначе синтез коллагеназы в виде профермента и сложные пути его активации обеспечивают возможность тонкой регуляции коллагенолитической активности в ткани.

Таким образом, рассмотрение данных изучения истинных коллагенолитических ферментов тканей животных позволяет сделать вывод о том, что коллагеназы играют главную роль в распаде коллагена. Тем не менее следует помнить, что в последнее время были получены убедительные доказательства участия в процессах распада коллагеновых белков других протеолитических ферментов — протеиназ лизосомного происхождения. Изучение этих ферментов в последнее время проводится очень интенсивно [108].

ЛИТЕРАТУРА

1. Gross J., Lapiere C. M. — Proc. nat. Acad. Sci. (USA), 1962, v. 48, p. 1014. — 2. Gross J. — In: Biochemistry of Collagen. Ed. G. N. Ramachandran, A. H. Reddi, New York, 1976, p. 275. — 3. Harris E. D., Cartwright E. C. — In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (Research Monographs in Cell and Tissue Physiology). Ed. A. J. Barret. New York, 1977, v. 2, p. 249. — 4. Huang C. C., Abramson M. — Biochim. biophys. Acta, 1975, v. 384, p. 484. — 5. Seifter S., Gallop P. M. — Meth. Enzymol., 1962, v. 5, p. 659. — 6. Shimizu M., Glimcher M. J., Travis D. et al. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1969, v. 130, p. 1175. — 7. McCroskery P. A., Wood S., Harris E. D. — Science, 1973, v. 182, p. 70. — 8. Werb Z., Burleigh M. — Biochem. J., 1974, v. 137, p. 373. — 9. Labrosse K. R., Liener I. E., Hargrove P. A. — Analyt. Biochem., 1976, v. 70, p. 218. — 10. Sakamoto S., Goldhaber P., Glimcher M. J. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1972, v. 139, p. 1038. — 11. Terato K., Nagai Y., Kawanishi K. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 445, p. 753. — 12. Bloomfield S. E., Brown S. I. — Invest. Ophthalm., 1974, v. 13, p. 547. — 13. Tokoro J., Eisen A. Z., Jeffrey J. J. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 258, p. 289. — 14. Sakamoto S., Goldhaber P., Glimcher M. J. — Calcif. Tissue Res., 1972, v. 10, p. 142. — 15. Jeffrey J. J., Gross J. — Biochemistry (Wash.), 1970, v. 9, p. 268. — 16. Jeffrey J. J., Coffey R. J., Eisen A. Z. — Biochim. biophys. Acta, 1971, v. 252, p. 136. — 17. Evanson J. M., Jeffrey J. J., Krane S. M. — Science, 1967, v. 158, p. 499. — 18. Evanson J. M., Jeffrey J. J., Krane S. M. — J. clin. Invest., 1968, v. 47, p. 2639. — 19. Bauer E. A., Striklin G. P., Jeffrey J. J. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1975, v. 64, p. 232. — 20. Birkedal-Hansen H., Cobb C. M., Taylor R. E. et al. — J. biol. Chem., 1976, v. 251, p. 3162. — 21. Horwitz A. L.,

Crystal R. G. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 69, p. 296. — 22. Werb Z., Gordon S. — *J. exp. Med.*, 1975, v. 142, p. 346. — 23. Werb Z., Reynolds J. J. — *Biochem. J.*, 1975, v. 151, p. 645. — 24. Nagai Y., Lapiere C. M., Gross J. — *Biochemistry (Wash.)*, 1966, v. 5, p. 3123. — 25. Eisen A. Z., Jeffrey J. J. — *Biochim. biophys. Acta*, 1969, v. 191, p. 517. — 26. Eisen A. Z., Bauer E. A., Jeffrey J. J. — *J. invest. Derm.*, 1970, v. 55, p. 359. — 27. Eisen A. Z., Henderson K. O., Jeffrey J. J. et al. — *Biochemistry (Wash.)*, 1973, v. 12, p. 1814. — 28. Lazarus G. S., Daniels J. R., Lian J. et al. — *Am. J. Path.*, 1972, v. 68, p. 565. — 29. Ohlsson K. — In: *Proteases and Biological Control*. Ed. E. Reich, D. B. Rivkin, E. Shaw. London, 1975, v. 2, p. 591. — 30. Eisen A. Z., Bauer E. A., Jeffrey J. J. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, p. 248. — 31. Ryan J. M., Woessner J. F. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1971, v. 44, p. 144. — 32. Weers J. G., Halme J., Woessner J. F. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 445, p. 205. — 33. Nagai Y. — *Molec. Cell Biochem.*, 1973, v. 1, p. 137. — 34. Sakamoto S., Sakamoto M., Goldhaber P. et al. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1973, v. 53, p. 1102. — 35. Wirl G. — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1975, Bd 356, S. 1289. — 36. Aers. — *Ann. Med. exp. Fenn.*, 1971, v. 49, p. 1. — 37. Harris E. D., Faulkner C. S., Wood S. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 48, p. 1247. — 38. Nagai Y., Hori H. — *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 263, p. 564. — 39. Puzas E., Brand J. S. — *Ibid.*, 1976, v. 429, p. 964. — 40. Weeks J. G., Halme J., Woessner J. F. — *Fed. Proc.*, 1972, v. 31, p. 920. — 41. Woessner J. F., Ryan J. N. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 309, p. 397. — 42. Bauer E. A., Jeffrey J. J., Eisen A. Z. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1971, v. 44, p. 813. — 43. Wolley D. E., Glanville R. W., Crossley M. J. et al. — *Europ. J. Biochem.*, 1975, v. 54, p. 611. — 44. Harper E., Bloch K. J., Gross J. — *Biochemistry (Wash.)*, 1971, v. 10, p. 3035. — 45. McCroskery P. A., Richards J. F., Harris E. D. — *Biochem. J.*, 1975, v. 152, p. 131. — 46. Sakamoto S., Sakamoto M., Goldhaber P. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1975, v. 385, p. 41. — 47. Nagai Y., Lapiere C. M., Gross J. — *Biochemistry (Wash.)*, 1966, v. 5, p. 3123. — 48. Kang A. H., Nagai Y., Piez K. A. et al. — *Ibid.*, 1966, v. 5, p. 509. — 49. Ohlsson K., Ohlsson I. — *Europ. J. Biochem.*, 1973, v. 36, p. 473. — 50. Birkedal-Hansen H., Taylor R. E., Fullmer H. M. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 420, p. 428. — 51. Wolley D. E., Glanville R. W., Evanson J. M. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1973, v. 51, p. 729. — 52. Stricklin G. P., Bauer E. A., Jeffrey J. J. et al. — *Biochemistry (Wash.)*, 1977, v. 16, p. 1607. — 53. Fullmer H. M., Taylor K. E., Guthrie R. W. — *J. dent. Res.*, 1972, v. 51, N 2, Pt 1, p. 349. — 54. Woessner J. F. — *Biochem. J.*, 1977, v. 161, p. 535. — 55. Nagai Y., Hori H. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 312, p. 742. — 56. Harris E. D., McCroskery P. A. — *New Engl. J. Med.*, 1974, v. 290, p. 1. — 57. Lazarus G. S., Daniels J. R., Brown R. S. et al. — *J. clin. Invest.*, 1968, v. 47, p. 2622. — 58. Sakamoto S., Goldhaber P., Glimcher M. J. — *Calcif. Tissue Res.*, 1973, v. 12, p. 247. — 59. Harris E. D., Farrell M. E. — *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 278, p. 133. — 60. Harris E. D., Krane S. M. — *New Engl. J. Med.*, 1974, v. 291, p. 605. — 61. Horwitz A. Z., Hance A. J., Crystal R. G. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 897. — 62. Robertson P. B., Miller E. Z. — *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 289, p. 247. — 63. Wolley D. E., Glanville R. W., Lindberg K. A. et al. — *FEBS Letters*, 1973, v. 34, p. 267. — 64. Wolley D. E., Lindberg K. A., Glanville R. W. et al. — *Europ. J. Biochem.*, 1975, v. 50, p. 437. — 65. Nagai J., Lapiere C. M., Gross J. — *Proc. Sixth Congr. Biochemistry* 11, 1966, p. 120. — 66. Gross J., Harper E., Harris E. D. et al. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 61, p. 605. — 67. Miller E. J., Harris E. D., Chung E. et al. — *Biochemistry (Wash.)*, 1976, v. 15, p. 787. — 68. Sisen A. Z., Jeffrey J. J., Gross J. — *Biochim. biophys. Acta*, 1968, v. 151, p. 637. — 69. Eisen A. Z., Bloch R. J., Sakai T. — *J. Lab. clin. Med.*, 1970, v. 75, p. 258. — 70. Abe S., Nagai Y. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1973, v. 73, p. 897. — 71. Bauer E. A., Eisen A. Z., Jeffrey J. J. — *J. clin. Invest.*, 1971, v. 50, p. 2056. — 72. Bauer E. A., Eisen A. Z., Jeffrey J. J. — *J. invest. Derm.*, 1972, v. 59, p. 50. — 73. Sakamoto S., Goldhaber P., Glimcher M. J. — *Calcif. Tissue Res.*, 1972, v. 10, p. 280. — 74. Abe S., Nagai Y. — *Biochem. biophys. Acta*, 1972, v. 278, p. 125. — 75. Berman M. B., Barber J. C., Talamo R. C. et al. — *Invest. Ophthalm.*, 1973, v. 12, p. 759. — 76. Werb Z., Burleigh M. C., Barratt A. J. et al. — *Biochem. J.*, 1974, v. 139, p. 359. — 77. Wolley D. E., Roberts D. R., Evanson J. M. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 66, p. 747. — 78. Wolley D. E., Tucker J. S., Green G. et al. — *Biochem. J.*, 1976, v. 153, p. 119. — 79. Wolley D. E., Roberts D. R., Evanson J. M. — *Nature*, 1976, v. 261, p. 325. — 80. Sellers A., Cartwright E., Murphy G. et al. — *Biochem. J.*, 1977, v. 163, p. 303. — 81. Sakamoto R., Sakamoto M., Goldhaber P. et al. — *Calcif. Tissue Res.*, 1974, v. 14, p. 291. — 82. Wojtecka-Lukasik E., Danciewicz A. M. — *Biochem. Pharmacol.*, 1974, v. 23, p. 2077. — 83. Harris E. D., Krane S. M. — *Arthr. a. Rheum.*, 1971,

v. 14, p. 669. — 84. Gordon S., Werb Z. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 872. — 85. Wahl Z. M., Wahl S. M., Mergenhagen S. E. et al. — Ibid., 1974, v. 71, p. 3598. — 86. Goldhaber P. — Science, 1965, v. 147, p. 407. — 87. Kaufman E. J., Glimcher M. J., Mechanic G. L. et al. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1965, v. 120, p. 632. — 88. Dougherty T. F., Berliner D. L. — In: Treatise on Collagen. Ed. G. Ramachandran. New York, 1968, v. 2, Pt A, p. 367. — 89. Stern B. D., Mechanic C. L., Glimcher M. J. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1963, v. 13, p. 137. — 90. Sakamoto S., Sakamoto M., Goldhaber P. et al. — Ibid., 1975, v. 63, p. 172. — 91. Jeffrey J. J., Coffey R. J., Eisen A. Z. — Biochim. biophys. Acta, 1971, v. 252, p. 143. — 92. Woessner J. F. — J. Endocr., 1976, v. 70, p. 157. — 93. Walker D. C., Lapiere C. M., Gross J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1964, v. 15, p. 397. — 94. Wahl L. M. — Ibid., 1977, v. 74, p. 838. — 95. Hong R. C., Cruess R. L. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1975, v. 148, p. 887. — 96. Koob T. J., Jeffrey J. J., Eisen A. Z. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1974, v. 61, p. 1083. — 97. Harper E., Gross J. — Ibid., 1972, v. 48, p. 1147. — 98. Vaes G. — Biochem. J., 1972, v. 126, p. 275. — 99. Vaes G. — FEBS Letters, 1972, v. 28, p. 198. — 100. Vaes G., Eeckhout Y. — Protides Biol. Fluids Proc. Colloq., 1974, v. 22, p. 391. — 101. Eeckhout Y., Vaes G. — Arch. int. Physiol. Bioch., 1974, v. 82, p. 786. — 102. Werb Z., Mainardi C. L., Vater C. A. et al. — New Engl. J. Med., 1977, v. 296, p. 1017. — 103. Oronsky A. L., Perper R. Y., Schroder H. C. — Nature, 1973, v. 246, p. 417. — 104. Kruse D., Wojtecka E. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 285, p. 436. — 105. Wize Y., Sopato I., Wojtecka-Lukasiak E. et al. — Acta biochim. pol., 1975, v. 22, p. 239. — 106. Birkebal-Hansen H., Cobb C. M., Taylor R. E., et al. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 429, p. 78. — 107. Birkebal-Hansen H., Cobb C. M., Taylor R. E. et al. — Ibid., 1976, v. 438, p. 273. — 108. Burleigh M. C. — In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (Research Monographs in Cell and Tissue Physiology), Ed. Barret A. J., New York, 1977, v. 2, p. 285.

Поступила 2/XI 1977 г

УДК 616.899.65-07:[616-008.935.862+616-008.935.874.2]-074

А. М. Шапошников, С. Е. Хальчицкий, Е. И. Шварц

НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА ФЕНИЛАЛАНИНА И ТИРОЗИНА ПРИ БОЛЕЗНИ ДАУНА

Отдел медицинской энзимологии Центральной научно-исследовательской лаборатории I Ленинградского медицинского института им. И. П. Павлова, академическая группа при член-корр. АМН СССР проф. Е. Ф. Давиденковой

Содержание фенилаланина и тирозина в сыворотке крови при болезни Дауна увеличено. При нагрузке L-фенилаланином (0,1 г/кг массы тела) 4 больных и 10 здоровых людей установлено, что при болезни Дауна нарушен обмен фенилаланина и тирозина. У больных уровень фенилаланина в $1\frac{1}{2}$ —2 раза повышается даже через 4 и 6 ч после нагрузки, а концентрация тирозина увеличивается незначительно. Фенилпириновградная кислота в моче отсутствует, а выделение гомогентизиновой кислоты снижено. Скорость реакции гидроксирования фенилаланина при болезни Дауна снижена по сравнению с таковой у здоровых людей.

Раскрытие патогенетических механизмов развития болезни Дауна и проведение на этой основе эффективных терапевтических мероприятий возможны лишь при детальном изучении симптомокомплекса основ хромосомного дисбаланса. Поскольку ведущим симптомокомплексом при трисомии по 21-й хромосоме являются психоневрологические расстройства, то особо важное значение имеют исследования метаболических систем, участвующих в обмене ароматических аминокислот. Патология обмена фенилаланина, тирозина и триптофана приводит к нарушению синтеза и метаболизма нейромедиаторов центральной нервной системы — адреналина, норадrenalина, дофамина, серотонина, что обуславливает развитие психических и неврологических расстройств при наследственных и экзогенных заболеваниях человека. Так, генетически детерминированное нарушение реакции гидроксирования фенилаланина и как следствие этого патологический обмен тирозина и триптофана приводит к слабоумию и другим расстройствам центральной нервной системы при «классической» форме фенилкетонурии

[1, 2], наследственная недостаточность дигидроптеридинредуктазы печени и мозга сопровождается умственной отсталостью, судорожными припадками [3, 4]. Генетический блок реакции превращения п-оксифенилпировиноградной кислоты в гомогентизиновую при тирозинемии вызывает тяжелые поражения печени и нервной системы [5], извращение обмена ароматических аминокислот определяет психоневрологическую симптоматику при заболеваниях, сопровождающихся поражением печени, таких, как вирусный гепатит, хронический алкоголизм и др. [2, 6, 7]. Эти данные показывают, что между расстройством обмена фенилаланина и тирозина и психоневрологическими нарушениями существует тесная взаимосвязь.

В здоровом организме основной путь превращения фенилаланина заключается в гидроксировании бензольного кольца с образованием тирозина. Эта реакция катализируется фенилаланин-гидроксилазной системой печени. Обязательными компонентами этой системы являются фенилаланин-4-гидроксилаза (КФ 1.14.3.1.), дигидроптеридинредуктаза, дигидрофолатредуктаза (КФ 1.5.1.3.), тетрагидробиптерин и НАДФ [4]. Снижение активности ферментов или концентрации кофакторов вызывает не только нарушение обмена фенилаланина, но и серьезные расстройства обмена тирозина и триптофана [8].

При болезни Дауна концентрация фенилаланина в сыворотке крови увеличена как у новорожденных [9], так и у более старших детей [10]. Нарушение обмена тирозина и триптофана при этом заболевании выражается в повышении их уровня в крови и патологической экскрецией метаболитов этих аминокислот с мочой [11]. Кроме того, установлено, что при болезни Дауна страдает структура и функция печени [12, 13]. Совокупность представленных данных позволяет предположить, что при этом заболевании страдает фенилаланин-гидроксилазная система печени.

Целью настоящей работы явилось изучение нарушения обмена фенилаланина и тирозина при болезни Дауна. Одним из методических приемов, дающих возможность оценить состояние фенилаланин-гидроксилазной системы, является изучение динамики превращения фенилаланина в тирозин при нагрузке людей фенилаланином [7, 14]. Следует подчеркнуть, что такое исследование при болезни Дауна проведено впервые.

М е т о д и к а

Обследовано 4 мальчика с болезнью Дауна в возрасте от 12 до 16 лет, находившихся в психоневрологическом интернате № 4 Ленинграда. Диагноз подтвержден кариологическим анализом и клиническими данными. У всех больных выявлена трисомия по 21-й хромосоме. Степень умственной отсталости у всех обследованных — имбицильность. Во время обследования у больных отсутствовали заболевания желудочно-кишечного тракта и патологии органов дыхания. Больные находились на обычном пищевом рационе и не получали никаких лекарственных препаратов. 4 больным и 10 здоровым людям в возрасте 16—17 лет проводили патоцак нагрузку per os L-фенилаланином (L-β-фенил-W-аланин, фирма «Рсанал», Венгрия) из расчета 0,1 г на 1 кг массы тела и из локтевой вены получали кровь до нагрузки и через 1, 2, 4 и 6 ч после нее. В те же сроки собирали порции мочи. В сыворотке крови флюориметрически определяли концентрацию фенилаланина и тирозина [6], в моче содержание фенилпировиноградной и гомогентизиновой кислот — как описано [15, 16]. Построение графиков скорости гидроксирования фенилаланина в организме при нагрузке этой аминокислотой проводили, как указано в [17]. Результаты обрабатывали статистически [18].

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

Из таблицы видно, что исходная концентрация фенилаланина в сыворотке крови у больных выше по сравнению с таковой в контрольной группе. У здоровых людей через 1 ч после нагрузки наблюдается максимальное повышение уровня фенилаланина. В последующем происходит снижение концентрации аминокислоты, и к 6 ч уровень фенилаланина возвращается к исходному. При болезни Дауна уровень фенилаланина через 1 ч после нагрузки несколько ниже, чем в контроле, и достигает максимума

к 2 ч. Основные различия в скорости гидроксилирования фенилаланина получены в последующие 4 ч после нагрузки. Уровень фенилаланина через 4 и 6 ч после нагрузки значительно (в $1\frac{1}{2}$ —2 раза) превышает таковой у здоровых людей и даже через 6 ч не возвращается к исходному. Фенилпировиноградная кислота в моче здоровых и больных детей отсутствовала как до, так и во все периоды после нагрузки. При расчете скорости гидроксилирования фенилаланина оказалось, что имеются существенные различия в скорости гидроксилирования фенилаланина в организме здоровых

Концентрация (в мг%) фенилаланина и тирозина в сыворотке крови и выделение гомогентизиновой кислоты с мочой после нагрузки L-фенилаланином больных и здоровых людей

Время, ч	Фенилаланин	Тирозин	Гомогентизиновая кислота
Больные болезнью Дауна			
0	2,5±0,30	1,66±0,12	9,0±0,12
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,1
1	6,3±0,47	2,07±0,15	10,4±0,39
<i>P</i>	>0,1	>0,1	<0,02
2	7,3±0,72	2,23±0,16	11,9±0,42
<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,05
4	5,1±0,26	2,27±0,09	11,8±0,63
<i>P</i>	<0,001	<0,02	<0,01
6	3,3±0,40	2,06±0,09	10,0±0,48
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,1
Здоровые люди			
0	1,8±0,24	1,20±0,04	9,9±0,48
1	7,4±0,96	1,92±0,08	12,8±0,65
2	5,6±0,21	1,75±0,1	15,4±1,32
4	2,3±0,09	1,46±0,07	16,8±1,25
6	1,8±0,18	1,42±0,11	13,5±2,0

Примечание. *P* дано по сравнению с контролем (здоровые люди).

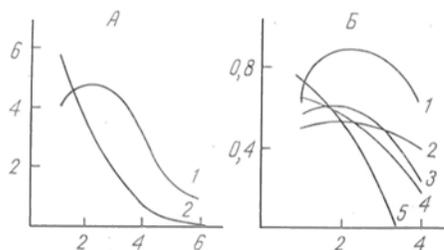
и больных людей (см. рисунок). Следует отметить, что подобная динамика гидроксилирования фенилаланина при нагрузке обнаружена у атипичных гомо- и гетерозиготных носителей гена фенилаланингидроксилазы [14] и у больных вирусным гепатитом [7].

В процессе нагрузки уровень тирозина в сыворотке крови и выделение гомогентизиновой кислоты с мочой у здоровых людей увеличиваются через 1, 2, 4, 6 ч на 60, 46, 22, 18 и 29, 56, 70, 14 % соответственно, а при болезни Дауна — на 25, 34, 37, 24 и 16, 32, 31, 11 % соответственно (за 100 % приняты концентрации до нагрузки у здоровых и больных). У здоровых людей после нагрузки фенилаланином уровень тирозина повышается максимально через 1 ч, и через 6 ч происходит постепенное снижение его в сыворотке крови, причем максимальное выделение гомогентизиновой кислоты с мочой отмечено через 4 ч после нагрузки. До нагрузки у больных концентрация тирозина в сыворотке крови достоверно выше таковой у здоровых людей, что согласуется с данными литературы [12]. Через 2—6 ч концентрация фенилаланина и тирозина достоверно выше у больных по сравнению с таковой в контрольной группе. Однако уровень тирозина в крови у больных в процессе нагрузки возрастает незначительно, причем экскреция гомогентизиновой кислоты с мочой снижается.

Приведенные данные показывают, что при болезни Дауна нарушен обмен фенилаланина: скорость реакции гидроксилирования этой аминокислоты ниже, чем у здоровых людей, что свидетельствует о нарушении фенилаланингидроксилазной системы печени. Нарушение обмена тирозина выражается не только в повышенном его содержании до нагрузки, но также

и в снижении экскреции с мочой гомогентизиновой кислоты после нагрузки фенилаланином.

Результаты проведенного исследования показывают, что при болезни Дауна концентрация фенилаланина в крови увеличена. Однако как до, так и в процессе нагрузки фенилаланином фенилпировиноградная кислота в моче не обнаруживается. Морфологические изменения ткани печени при болезни Дауна [12, 13] очень сходны с нарушением структуры печени у больных вирусным гепатитом и алкоголизмом [17, 19]. Однако содержание фенилаланина в сыворотке крови у больных вирусным гепатитом сред-



Изменение содержания фенилаланина в сыворотке крови в процессе нагрузки L-фенилаланином у больных болезнью Дауна и у здоровых людей.

По оси ординат: А — $(\Phi - \Phi_0)$ (в мг%); Б — $\lg(\Phi - \Phi_0)$, где Φ — концентрация фенилаланина в сыворотке крови через 1, 2, 4 и 6 ч после нагрузки, Φ_0 — концентрация фенилаланина в сыворотке крови до нагрузки (в ч). А: 1 — больные; 2 — здоровые люди; Б: 1—4 — больные, 5 — здоровый человек.

нетяжелой формы составляет от $2,1 \pm 0,36$ до $2,9 \pm 0,53$ мг%, а экскреция фенилпировиноградной кислоты с мочой — 40—65 мг/сут [6], а у больных алкоголизмом при концентрации фенилаланина в крови $2,43 \pm 0,16$ мг% выделение фенилпировиноградной кислоты составляет $5,7 \pm 0,6$ мг/сут, причем после нагрузки L-фенилаланином экскреция фенилпировиноградной кислоты резко возрастает [19]. Отсутствие выделения фенилпировиноградной кислоты с мочой в процессе нагрузки фенилаланином при болезни Дауна, вероятно, обусловлено нарушением переаминирования фенилаланина, так как показано извращение метаболизма и экскреции фенилпировиноградной кислоты при снижении или отсутствии активности цитоплазматической тирозинаминотрансферазы печени (КФ 2.6.1.5.) [20]. Изменение скорости гидроксирования фенилаланина (см. рисунок) может быть обусловлено снижением активности фенилаланингидроксилазы и (или) дегидронтеридинредуктазы, но не дегидрофлатредуктазы, так как показано, что активность этого фермента при болезни Дауна увеличена [21]. Содержание тетрагидробиоптерина — необходимого кофактора фенилаланингидроксилазной системы печени — при болезни Дауна, вероятно, не изменено, так как активность тетрагидрофлатдегидрогеназы больных не отличается от активности у здоровых людей [21].

Гипертирозинемия при болезни Дауна не связана с ускоренным образованием тирозина, о чем свидетельствуют наши данные (см. таблицу). Снижение активности или содержания компонентов фенилаланингидроксилазной системы должно приводить к снижению уровня тирозина в крови. В процессе нагрузки фенилаланином концентрация тирозина в крови больных увеличивается незначительно. Следовательно, стойкая гипертирозинемия при болезни Дауна обусловлена другими причинами. Одной из них может быть снижение активности цитоплазматической и (или) митохондриальной тирозинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.1.). Изменение активности этих ферментов может быть вызвано недостатком пиридоксаль-5-фосфата, так как установлено, что содержание витамина B_6 в тканях при болезни Дауна снижено [22, 23]. Нарушение трансаминирования тирозина подтверждается сниженной экскрецией гомогентизиновой кислоты. Вероятно, снижение экскреции этого продукта обмена тирозина обусловлено медленным образованием п-оксифенилпировиноградной кислоты в печени и почках в результате снижения активности тирозинаминотрансфераз или оксидазы п-оксифенилпировиноградной кислоты (КФ 1.14.2.2.) в этих органах, так как в других тканях организма этот фермент отсутствует [24]. Кроме того, снижение активности оксидазы п-оксифенилпировиноградной кислоты может быть обусловлено действием фенилаланина и его дериватов

[2]. Гиперфенилаланинемия при болезни Дауна выявляется с периода новорожденности [9]. Вполне вероятно, что дисбаланс тирозина и триптофана, а также других аминокислот при этом заболевании является вторичным в результате аллостерического влияния фенилаланина и его метаболитов на ферменты, осуществляющие превращения тирозина и триптофана. Это положение подтверждается тем, что гиперфенилаланинемия вызывает нарушение синтеза гормонов — медиаторов центральной нервной системы — при наследственной и экзогенной патологии [1, 2, 6, 7]. Таким образом, нарушение обмена фенилаланина и тирозина при болезни Дауна может явиться одним из факторов нарушения синтеза нейромедиаторов и быть одной из причин развития слабоумия при этом заболевании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Menkes J. H. — *Pediatrics*, 1967, v. 39, p. 297—308. — 2. Нейфак С. А., Шапошников А. М. — *Ж. невропатол. и психиатр.*, 1965, № 7, с. 1104—1113. — 3. Milstien S., Kaufman S. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 66, p. 475—481. — 4. Kaufman S., Holtzman N. A., Milstein S., Butler I. J. et al. — *New Engl. J. Med.*, 1975, v. 293, p. 785—790. — 5. Scriver C. R., Davies E. — *Canad. med. Ass. J.*, 1967, v. 97, p. 1076—1078. — 6. Шапошников А. М., Доброборская Т. Н., Скачков М. М. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 6, с. 603—608. — 7. Шапошников А. М., Скачков М. М., Бабицкий Г. Я. — Там же, 1977, № 5, с. 597—601. — 8. Kaufman S., Maх E. E. — In: *Phenylketonuria* Ed. H. Bickel, F. P. Hudson, L. J. Wolf. Stuttgart, 1971, S. 13—19. — 9. Varelius L., Deas M. — A., Varelius N. — *Rev. roum. Embriol.*, 1972, v. 9, p. 109—112. — 10. Давиденкова Е. Ф. *Болезнь Дауна*. Л., 1966. — 11. Концевая Н. Г., Риднер М. С. — *Педиатрия*, 1972, № 3, с. 52—56. — 12. Велда С. Е. — In: *The Child With Mongolism*. London, 1960, p. 139—145. — 13. Kahane S., Kluka V., Grega J. et al. — *Csl. Pediat.*, 1975, v. 30, p. 470—474. — 14. Wolf L. J., Cranston W. J., Goodwin B. L. — *Nature*, 1967, v. 213, p. 882—885. — 15. Шапошников А. М., Скачков М. М. — *Лабор. дело*, 1975, № 7, с. 422—424. — 16. Концевая Н. Г. — Там же, 1968, № 3, с. 163—164. — 17. Блюгер А. Ф. *Вирусный гепатит и его исходы*. Рига, 1970. — 18. Каминский Л. С. *Статистическая обработка лабораторных и клинических данных*. Л., 1964. — 19. Шапошников А. М., Скачков М. М. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 4, с. 495—499. — 20. Kennaway N. G., Buist N. R. — *Pediat. Res.*, 1971, v. 5, p. 287—289. — 21. Holtzmann H., Morschs B., Sachsse W. — *Klin. Wschr.*, 1967, Bd 45, S. 363—368. — 22. McCou E. E., Anast C. S., Naylor J. J. — *J. Pediat.*, 1964, v. 65, p. 208—212. — 23. Coburn S. R., Feidenberg M. — *Fed. Proc.*, 1968, v. 27, p. 555. — 24. Fellman J. H., Buist N. R., Kennaway N. G. et al. — *Clin. chim. Acta*, 1972, v. 39, p. 234—240.

Поступила 23/V 1978 г.

IMPAIRMENT OF PHENYLALANINE AND TYROSINE METABOLISM IN MONGOLISM

A. M. Shaposhnikov, S. E. Khalchitsky, E. I. Shwartz

Department of Medical Enzymology, Central Research Laboratory, I. P. Pavlov I Medical School, and the Academic Group of Corresponding Member E. F. Davidenkova of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Content of phenylalanine and tyrosine was increased in blood serum in mongolism. When 4 patients with mongolism and 10 healthy persons were loaded with l-phenylalanine, content of the amino acid in blood serum of patients exceeded 1.5-2-fold that found in healthy persons within 4 and 6 hrs after the treatment. The hydroxylation rate of phenylalanine was lower in mongolism as compared to normal state; it corresponded to the rate of phenylalanine hydroxylation in atypical homo- and heterozygote patients bearing «phenylketonuria» gene and in patients with viral hepatitis. Concentration of tyrosine was distinctly higher in the impaired patients within 2-6 hrs after the loading as compared with the healthy persons. But content of tyrosine was increased only slightly in patients with mongolism during the loading and excretion of homogentisic acid with urine was decreased. These data suggest that activity of phenylalanine hydroxylase system is impaired in liver tissue in mongolism. Excretion of phenylpyruvic acid with urine was not observed in the patients and healthy persons both before and during the amino acid loading. The data obtained suggest that impairment of phenylalanine and tyrosine turnover in mongolism appears to be one of the factors responsible for disturbance of neurotransmitter synthesis and to be related to development of mental retardation.

Р. Р. Рачев, М. И. Димитров

ДЕЙСТВИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА СИНТЕЗ
БЕЛКА В МИКРОСОМАХ IN VITRO

Центральная биофизическая лаборатория, Болгарская Академия Наук, София

I₂ и ICI оказывают тироксинподобное действие на синтез белка в микросомах, изолированных из печени молодых тиреоидэктомированных крыс и инкубированных в среде, содержащей ³H-глицин или L-¹⁴C-лейцин. Трийодтиронин T₃ и йодсодержащие вещества повышали включение меченых аминокислот в белки микросом в 3,5—3,9 раза по сравнению с микросомами исходных, тиреоидэктомированных крыс. Стимулирующий эффект T₃ и йодных ионов на синтез белка в микросомах снимался оливомицином и циклогексимидом. ICI имел значительно более короткий, чем T₃, латентный период действия на синтез белка в микросомах тиреоидэктомированных животных.

Включение меченых предшественников в бесклеточные системы успешно используется для получения информации о физиологическом и патологическом действии различных веществ на метаболизм клетки. Найдено, что микросомы и рибосомы, выделенные из различных органов животных, активно включают меченые аминокислоты в белки [1, 2]. Белоксинтезирующая активность этих частиц в большой степени зависит от функционального состояния цитовидной железы животных и концентрации тиреоидных гормонов в организме. Тиреоидные гормоны у тиреоидэктомированных животных повышали как активность включения меченых аминокислот в белки микросом [3, 4], так и активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы [5, 6] и синтез РНК [7]. В клеточных ядрах животных открыты рецепторы для тироксина (T₄) и трийодтиронина (T₃) [8—10]. Установлено, что ядерные рецепторы тиреоидных гормонов являются негистоновыми белками, вероятно, связанными с ДНК [9, 10]. Эти данные совпадают с концепцией о том, что тиреоидные гормоны реализуют свой эффект, контролируя реакции, связанные с активностью транскрипции. Хотя и обнаружено, что T₃ и T₄ вызывают одинаковые метаболические эффекты [11], еще многое неизвестно о молекулярном механизме действия тиреоидных гормонов и их метаболически активной форме.

Установлено, что ионы йода способны вызывать ряд эффектов, характерных для тиреоидных гормонов [12—16]. Поэтому предполагается, что тиреоидные гормоны после их дейодирования могут реализовать свой биологический эффект на молекулярном уровне с помощью ионов йода [17—20].

В настоящей работе исследовали влияние I₂ и ICI на включение ³H-глицина и L-¹⁴C-лейцина in vitro в белки микросом печени тиреоидэктомированных крыс и сравнивали его с действием T₃ на эти реакции. Поскольку изолированные микросомы не обладают пулом свободных аминокислот, а меченые ³H-глицин и L-¹⁴C-лейцин брали в равных концентрациях во всех пробах, в этом случае можно говорить не просто о включении аминокислот в белки, но скорее о синтезе белка.

Методы исследования

20—25-дневным самцам белых крыс была произведена тиреоидэктомия. Контрольных животных подвергали ложной операции. После операции животных в течение 6 дней оставляли при матери, а за 4 дня до опыта переводили на обыкновенную лабораторную диету. Эксперимент проводили на 10-й день после тиреоидэктомии. Животным внутрибрюшинно вводили T₃, I₂ или ICI за 24 ч до опыта и распределяли в следующие группы: 1) контрольные животные (ложнооперированные) — К; 2) тиреоидэктомированные крысы (T₀); 3) T₀+I₂ (2,5 мкг на 100 г массы); 4) T₀+ICI (25 мкг на 100 г массы); 5) T₀+T₃ (25 мкг на 100 г массы); 6) К+оливомицин (200 мкг на 100 г массы); 7) T₀+T₃+оливомицин (200 мкг на 100 г массы); 8) T₀+ICI+оливомицин (200 мкг на 100 г массы).

Оливомицин вводили двукратно внутрибрюшинно: первую инъекцию из расчета 100 мкг на 100 г делали за 3 ч до введения T₃ или ICI, а вторую — за 12 ч до декапитации животных. Каждая группа включала 3—4 животных. После обезглавливания животных

извлеченные печени промывали в холодном растворе 0,14 М NaCl и гомогенизировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозы; 50 мМ KCl; 10 мМ MgCl₂; 5 мМ трис-HCl буфера pH 7,6. Митохондрии выделяли при 16 000 g в течение 10 мин, а микросомы изолировали из постмитохондриального супернатанта при 105 000 g в течение 1 ч при температуре 0°C. Микросомальный осадок суспензировали в среде выделения из расчета 4 мг белка на 1 мл. Использовали инкубационную среду [21] с незначительными модификациями. В состав среды входило: 35 мМ трис-HCl буфера pH 7,6; 15 мМ KCl; 9 мМ MgCl₂; 0,20 М сахарозы; 1,5 мкМ АТФ; 0,33 мкМ ГТФ; 26 мкМ креатинфосфата; 0,2 мг креатинфосфокиназы; 45 мкг смеси всех аминокислот, за исключением меченой; 1 мкКи ³H-глицина (удельная радиоактивность 250 мкКи/ммоль, Amersham) или 1 мкКи L-¹⁴C-лейцина (удельная радиоактивность 125 мкКи/ммоль, ЧССР). В пробы вносили по 1 мл суспензии микросом (4 мг белка). Общий объем проб равнялся 2 мл. В некоторые пробы добавляли циклогексимид в количестве 50, 250 или 500 мкг. Микросомы инкубировали в аэробных условиях при температуре 37°C в течение 60 мин при встряхивании. Пробы для анализа брали на 5, 15, 30 или 60-й минуте инкубации. Реакцию прекращали с помощью 10% ТХУ. Радиоактивность белка в пробах измеряли после его очистки по методу [21], используя сцинтилляционный счетчик Packard Tricarb Scintillation Spectrometer Model 3320. Радиоактивность выражали в импульсах в минуту в расчете на 1 мг белка (удельная активность). Белок определяли по методу Лоури [22].

Результаты

На рис. 1 и 2 представлены результаты определения интенсивности включения ³H-глицина и L-¹⁴C-лейцина *in vitro* в белки микросом, изолированных из печени ложнооперированных, тиреоидэктомированных крыс

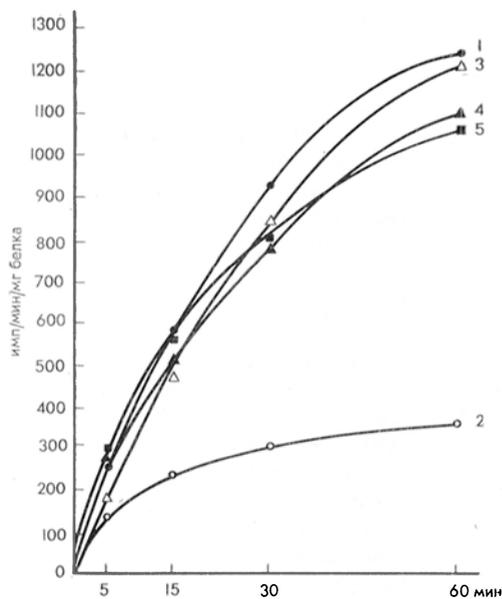


Рис. 1. Влияние T₃, I₂ и ICl на включение *in vitro* ³H-глицина в белки микросом печени крыс.

1 — ложнооперированные животные; 2 — тиреоидэктомированные крысы (T₀); 3 — T₀+I₂; 4 — T₀+ICl; 5 — T₀+T₃.
Здесь и на рис. 2 — по оси абсцисс — время инкубации.

и животных, которым после тиреоидэктомии вводили T₃, ¹²⁵I₂ или ICl. Видно, что включение меченых аминокислот в белки микросом контрольных животных почти линейно возрастает с увеличением времени инкубации. Подобная линейность в микросомах тиреоидэктомированных крыс не наблюдается, а скорость увеличения удельной радиоактивности белка после 15 мин инкубации уменьшается и кривая приобретает почти горизонталь-

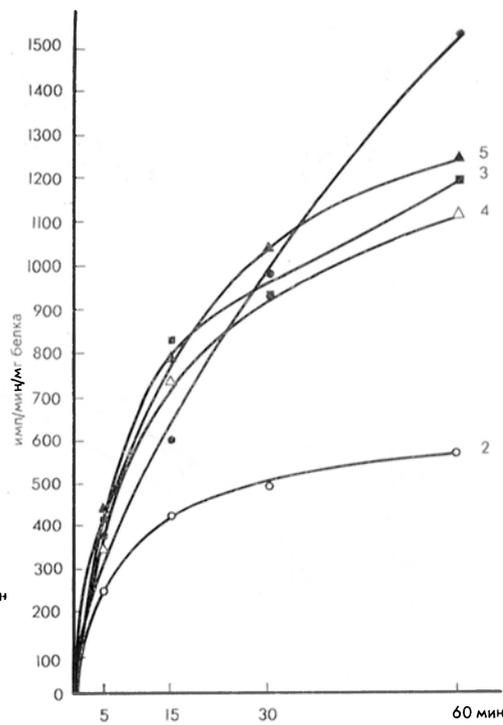


Рис. 2. Действие T₃ и йодсодержащих соединений на синтез белка в микросомах печени *in vitro* в присутствии L-¹⁴C-лейцина в инкубационной среде.

1 — ложнооперированные животные; 2 — тиреоидэктомированные крысы (T₀); 3 — T₀+T₃; 4 — T₀+I₂; 5 — T₀+ICl.

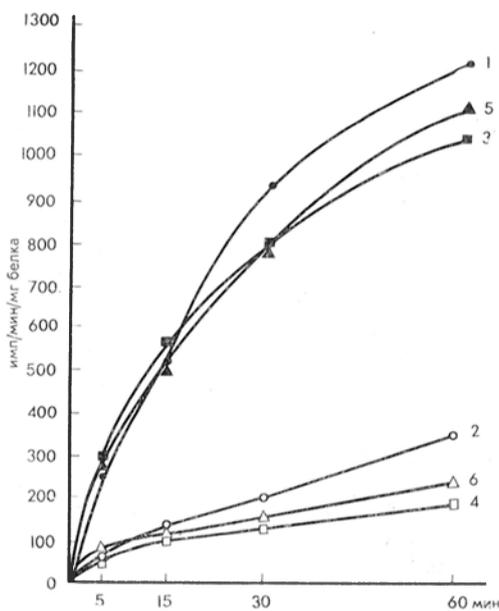


Рис. 3. Действие оливомицина на включение ³H-глицина в белки микросом печени животных разных экспериментальных групп.

1 — ложнооперированные животные (К); 2 — К + I₂ + оливомицин; 3 — тиреоидэктомированные (Т₀) + Т₃; 4 — Т₀ + Т₃ + оливомицин; 5 — Т₀ + ICl; 6 — Т₀ + ICl + оливомицин.

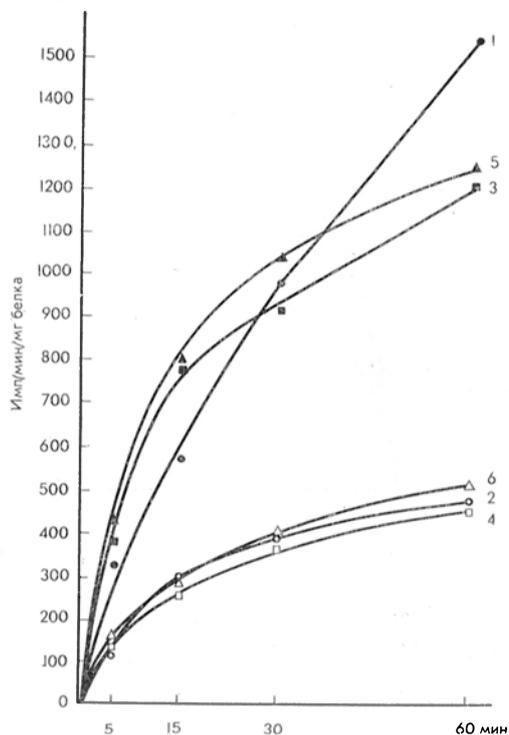


Рис. 4. Действие оливомицина на включение ¹⁴C-лейцина в белки в микросом печени животных разных экспериментальных групп.

Обозначения, как на рис. 3.

ный ход. В результате такого хода кривых различия в активности включения в белки микросом ложнооперированных и тиреоидэктомированных животных с увеличением времени инкубации возрастают. Например, активность включения меченых аминокислот в белки микросом ложнооперированных крыс на 5-й минуте опыта в 2 раза выше, чем у тиреоидэктомированных животных, на 30-й минуте разница возрастает до 3 раз, а на 60-й минуте — более чем в 4 раза. Замечено, что микросомы печени тиреоидэктомированных животных *in vitro* быстро теряют способность включать меченые аминокислоты. При введении Т₃ крысам с удаленной щитовидной железой за 24 ч до опыта восстанавливается интенсивность синтеза белка в микросомах печени *in vitro*. Однократное введение I₂ или ICl оперированным крысам также стимулирует активность включения радиоактивных предшественников до величин, наблюдавшихся в контроле и превышающих включение у тиреоидэктомированных крыс в 3,5—3,9 раза.

Результаты, полученные в опытах с йодсодержащими веществами, показывают, что они индуцируют изменения в клетках печени тиреоидэктомированных крыс, подобные стимуляции синтеза белка в микросомах под действием тиреоидных гормонов. Механизм влияния Т₃ и йодных соединений на синтез белка пока не известен.

Для установления, на каком уровне—транскрипции или трансляции—действуют Т₃ и ионы йода, в экспериментах дополнительно использовались оливомицин и циклогексимид.

Влияние оливомицина. Как известно, оливомицин ингибирует синтез РНК в клетке [23]. Полученные в опытах с этим антибиотиком результаты представлены на рис. 3 и 4. Видно, что оливомицин снимает стимулирующий эффект Т₃ и ICl на

включение ^3H -глицина и ^{14}C -лейцина в белки микросом печени тиреоидэктомированных животных и при этом резко ингибирует синтез белка в микросомах печени ложнооперированных животных.

Результаты опытов с оливомицином дают основание предполагать, что T_3 и йодные ионы стимулируют синтез белка, модифицируя транскрипционную активность клетки.

Эффект циклогексимида. Циклогексимид, являющийся специфическим ингибитором синтеза белка в цитоплазме, добавляли к инкубационной среде по 25, 125 или 250 мкг на 1 мл.

Результаты, полученные в опытах с циклогексимином, представлены на рис. 5 и 6. Отчетливо видно, что при всех использованных концентрациях циклогексимида ингибирует скорость включения ^3H -глицина (см. рис. 5) и ^{14}C -лейцина (см. рис. 6). Эффект антибиотика зависел прежде всего от его концентрации и исходной активности синтеза белка в микросомах печени животных разных экспериментальных групп. При концентрации 25 мкг/мл циклогексимид ингибировал на 70% включение меченых предшественников в белки микросом печени ложнооперированных и тиреоидэктомированных животных, обработанных T_3 и ICl . В то же время в микросомах тиреоидэктомированных животных, для которых характерна исходная низкая скорость синтеза белка, циклогексимид ингибировал включение радиоактивного предшественника только на 30%.

При концентрации 125 и 250 мкг/мл циклогексимид полностью блокировал включение ^{14}C -лейцина в белки микросом (см. рис. 6). Эти данные указывают на синтез белка в микросомах, а не на адсорбцию радиоактивных аминокислот на них.

Латентный период действия T_3 и ICl . В литературе имеются данные об индуцировании экстратиреоидного синтеза T_3 и T_4 под влиянием длительного введения йодида тиреоидэктомированным животным [24]. Для выяснения подобной возможности мы исследовали и сравнивали латентные периоды действия T_3 и ICl на реакцию синтеза белка в микросомах. Из кривых на рис. 7, отражающих данные о величине латентного периода для T_3 и ICl , видно, что ионы йода имеют более короткий латентный период по сравнению с T_3 в отношении включения ^{14}C -лейцина в белки мик-

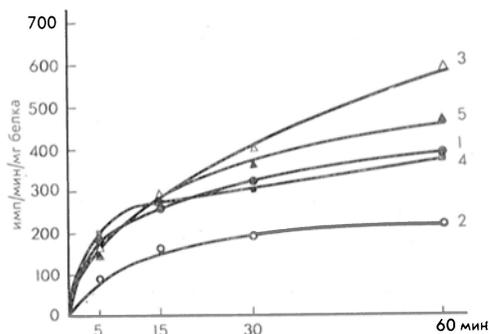


Рис. 5. Действие циклогексимида (25 мкг/мл) на включение ^3H -глицина в белки микросом печени животных разных экспериментальных групп.

1 — ложнооперированные; 2 — тиреоидэктомированные крысы (T_0); 3 — $\text{T}_0 + \text{T}_3$; 4 — $\text{T}_0 + \text{ICl}$; 5 — $\text{T}_0 + \text{ICl}$.

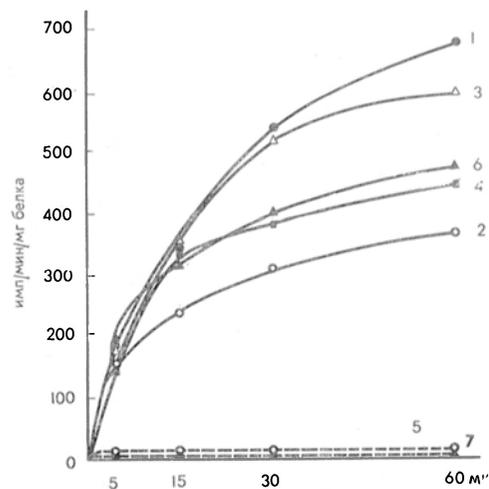


Рис. 6. Влияние циклогексимида на включение ^{14}C -лейцина в белки микросом печени животных разных экспериментальных групп.

1 — ложнооперированные; 2 — тиреоидэктомированные (T_0); 3 — $\text{T}_0 + \text{I}_2$; 4 — $\text{T}_0 + \text{T}_3$; 5 — $\text{T}_0 + \text{T}_3$; 6 — $\text{T}_0 + \text{ICl}$; 7 — $\text{T}_0 + \text{ICl}$.

Во всех пробах, отмеченных непрерывной линией, циклогексимид брали в концентрации 25 мкг/мл; в пробах, обозначенных пунктирной линией, концентрация циклогексимида была 250 мкг/мл.

росом. Стимулирующий эффект ICl проявляется уже через 30 мин после его введения, а действие T_3 — только на 2-м часу опыта. Результаты этих экспериментов ясно показывают, что действие T_3 и йодных ионов на синтез белка в микросомах печени тиреоидэктомированных крыс проявляется после различных по длительности латентных периодов. Ионы йода оказывают свое действие на синтез белка в микросомах печени через более короткое время, чем T_3 . Это указывает еще и на то, что стимулирующий эффект ионов

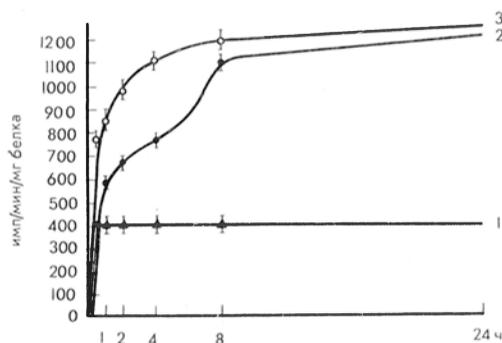


Рис. 7. Латентный период действия T_3 и ICl на скорость включения $L-^{14}C$ -лейцина в белки микросом печени тиреоидэктомированных крыс. Во всех пробах время инкубации микросом — 60 мин.

1 — тиреоидэктомированные крысы (T_0);
2 — $T_0 + T_3$; 3 — $T_0 + ICl$.
По оси абсцисс время после введения T_3 или ICl .

йода на скорость включения ^{14}C -лейцина в белки микросом печени тиреоидэктомированных крыс является прямым и не зависит от гормонов щитовидной железы. Напротив, пока нельзя исключить возможность реализации стимулирующего действия T_3 на синтез белка с помощью ионов йода после их освобождения при дейодировании гормона. В этом случае дейодирование T_3 представляет собой необходимую реакцию для перехода гормона из неактивной в метаболически активную форму.

Обсуждение результатов

В наших опытах были использованы животные, находящиеся в периоде усиленного роста. В это время интенсивно протекающие реакции синтеза белка в клетках в значительной степени зависят от функционального статуса щитовидной железы и количества тиреоидных гормонов в организме. На фоне повышенной потребности клетки в тиреоидных гормонах у быстро растущих животных можно наилучшим образом продемонстрировать как биологический эффект тироксина и трийодтиронина на синтез белка, так и возможность существования тироксиноподобного действия ионов йода на эти процессы. При этом стимулирующий эффект ионов йода может проявляться только в отсутствие щитовидной железы у животных.

Результаты, представленные в настоящей работе, показывают, что при отсутствии щитовидной железы в организме тиреоидэктомированных животных отмечается снижение активности синтеза белка в микросомах печени (см. рис. 1 и 2). В результате введения T_3 , I_2 или ICl тиреоидэктомированным животным удается исправить дефект операции, вызванный отсутствием тиреоидных гормонов. Эти результаты показывают, что ионы йода, подобно тиреоидным гормонам, способны контролировать некоторые звенья в механизмах, регулирующих системы синтеза белка в клетках животных.

Эксперименты с олибонидном, который снимает стимулирующий эффект T_3 и ICl на интенсивность включения *in vitro* 3H -глицина и ^{14}C -лейцина в белки микросом (см. рис. 3 и 4), позволяют предположить, что чувствительные к этим веществам звенья тесно связаны с регуляторными механизмами транскрипции.

Результаты определения длительности латентного периода T_3 и ICl свидетельствуют о том, что стимулирующий эффект ионов йода является прямым и не зависит от действия тиреоидных гормонов.

Механизм тироксинподобного действия ионов йода на синтез белка в микросомах, изолированных из печени тиреоидэктомированных животных, пока неизвестен. Чтобы объяснить связь между стимулирующим эффектом тиреоидных гормонов и ионов йода на синтез белка, можно сделать следующие предположения. Во-первых, атомы йода в молекуле тиреоидных гормонов являются активными компонентами, которые после дейодирования вызывают эффект гормонов на молекулярном уровне. В этом случае дейодирование T_4 , T_3 и их производных является необходимой фазой в переходе молекулы от неактивной к метаболически активной форме. Интактные молекулы T_3 и T_4 в этом варианте представляют собой подходящую форму для транспорта активных ионов йода к тем субклеточным структурам, для биологической активности которых требуются тиреоидные гормоны или ионы йода. Дейодаза обнаружена во всех исследованных субклеточных структурах [25, 26].

Известно, что среди негистоновых белков хроматина имеются рецепторы для T_3 и T_4 [9, 10], которые также активно связывают ^{125}I . В наших неопубликованных исследованиях установлено, что ICl , подобно немецену T_3 , *in vivo* и *in vitro* конкурирует за связывание с ^{125}I -трийодтиронином с рецепторами ядер печени. Можно предположить, что во время йодирования за счет интактной молекулы T_3 (T_4) или йодных ионов в белках хроматина происходят конформационные микроизменения, в результате чего может изменяться и транскрипционная активность хроматина. Местом, связывающим атомы йода в молекулах белка, являются ароматические аминокислотные остатки, в частности тирозиновые и гистидиновые [27—29], а в молекуле нуклеиновых кислот — цитидиловые основания [30, 31].

Интересно отметить, что пептиды, богатые тирозином и другими ароматическими аминокислотами, активно связываются с ГЦ-парами ДНК, встраиваясь между ее основаниями. Взаимодействие таких пептидов с молекулой ДНК стабилизирует ее структуру [32—34]. Йодирование тирозиновых остатков этих пептидов снимает их стабилизирующее действие на ДНК [34]. В свете этих данных можно предположить, что при физиологических условиях йодирование (за счет T_3 или ионов йода) некоторых негистоновых фракций белков хроматина может привести к их «десинтеграции» от ДНК и тем самым облегчить процесс транскрипции.

Второе предположение сводится к тому, что как ионы йода, так и интактные молекулы тиреоидных гормонов способны осуществлять самостоятельно и независимо друг от друга стимулирующее влияние на синтез белка. В этом случае, по всей вероятности, тиреоидные гормоны и ионы йода должны были бы взаимодействовать с одними и теми же «рецепторными местами», чтобы вызывать аналогичные структурные и функциональные изменения компонентов хроматина. Не исключена возможность, конечно, что именно ароматические аминокислотные остатки в негистоновых белках хроматина являются одновременно и «рецепторами», и «эффекторами» для ионов йода и тиреоидных гормонов, посредством которых они реализуют свое стимулирующее влияние на синтез белка.

Кроме того, возможно еще, что после йодирования ароматических аминокислотных остатков белков на уровне хроматина возникают йодированные структуры (моно- и дийодтирозиловые), близкие к структуре тиреоидных гормонов, с аналогичными функциональными эффектами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корнер А. — *Biochem. J.*, 1961, v. 81, p. 168. — 2. Hawtrey A. L., Schirren B. — *Biochim. biophys. Acta*, 1962, v. 61, p. 467. — 3. Stein O., Gross J. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1962, v. 109, p. 817. — 4. Sokoloff L., Francis C. M., Campbell P. L. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1964, v. 52, p. 728. — 5. Tata J. R., Widnell C. C. — *Biochim. biophys. Acta*, 1966, v. 98, p. 604. — 6. Gadaleta M. N., Di Reda N., Saccone C. — *Europ. J. Biochem.*, 1975, v. 51, p. 495. — 7. Tata J. R. — *Biochim. biophys. Acta*, 1964, v. 87,

p. 528. — 8. Oppenheimer J. H., Schwartz H. L., Koerner D. et al. — J. clin. Invest., 1974, v. 53, p. 768. — 9. Surks M. I., Koerner D., Dillman W. et al. — J. biol. Chem., 1973, v. 248, p. 7066. — 10. Thomopoulos P., Dastugue B., Defer N. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1974, v. 58, p. 499. — 11. Primack M. P., Tapley D. F., Buchanan J. — Biochim. biophys. Acta, 1971, v. 244, p. 349. — 12. Rall J. E., Michel R., Roche J. et al. — J. biol. Chem., 1963, v. 238, p. 1848. — 13. Rachev R. R., Dimitrov O. A., Philipova E. H. et al. — J. Bioenerg., 1973, v. 5, p. 17. — 14. Varrone S., Consiglio E., Covelli O. — Europ. J. Biochem., 1970, v. 13, p. 305. — 15. Jolin T., Morreale De Ascobar G. — Biochem. J., 1971, v. 125, p. 869. — 16. Колотилова А. И., Кудрявцева Г. В., Рачев Р. Р. и др. — Вопр. мед. химии, 1974, № 2, с. 155. — 17. Galton V. A., Ingbar S. H. — Endocrinology, 1961, v. 69, p. 30. — 18. Galton V. A., Ingbar S. H. — Ibid., 1962, v. 70, p. 622. — 19. Рачев Р. Р. Окислительное фосфорилирование в митохондриях и тиреоидные гормоны. Дис. докт. Л., 1969. — 20. Gruenstein E., Wunn J. — J. theor. Biol., 1970, v. 26, p. 343. — 21. Rabson R., Novelli G. D. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1960, v. 46, p. 484. — 22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265. — 23. Gause G. C., Loshkareva N. P., Zbarsky I. B. — Biochim. biophys. Acta, 1968, v. 166, p. 752. — 24. Taurog A., Evans E. S. — Endocrinology, 1967, v. 80, p. 915. — 25. Albright E. C., Tomita K., Larson F. C. — Ibid., 1959, v. 64, p. 208. — 26. Yamazaki E., Sliengerland D. W. — Ibid., p. 126. — 27. Koshland M. E., Englberger F. M., Erwin M. J. et al. — J. biol. Chem., 1963, v. 238, p. 1343. — 28. Covelli I., Wolff J. — Ibid., 1966, v. 241, p. 4444. — 29. Parker D. J., Allison W. S. — Ibid., 1969, v. 244, p. 180. — 30. Commerford S. L. — Biochemistry (Wash.), 1971, v. 10, p. 1993. — 31. Brammer K. W. — Biochim. biophys. Acta, 1963, v. 72, p. 217. — 32. Novak R. L., Dohnal J. — Nature, New Biol., 1973, v. 243, p. 155. — 33. Novak R. L., Dohnal J. — Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, p. 753. — 34. Novak R. L., Dohnal J. — Ibid., p. 761.

Поступила 2/II 1978 г.

EFFECT OF THYROID HORMONES ON PROTEIN SYNTHESIS IN MICROSOMES IN VITRO

R. R. Rachev, M. I. Dimitrov

Central Laboratory of Biophysics, Academy of Sciences of Bulgaria, Sofia

I_2 and ICl were shown to possess the thyroxin-like effect on protein synthesis in microsomes, isolated from liver tissue of young thyroidectomized rats and incubated in the medium containing 3H -glycine and L - ^{14}C -leucine. Triiodothyronine and iodine-containing substances increased 3.5-3.9-fold the incorporation of these labelled amino acids into microsomal proteins as compared with untreated microsomes from thyroidectomized rats. Olivomycin and cycloheximide abolished the stimulating effect of T_3 and iodine ions on the protein synthesis in microsomes. ICl exhibited a distinctly shorter, as compared with T_3 , latent period of action on the protein synthesis in microsomes of thyroidectomized animals.

УДК 612.398.6-06:612.44.018-085.2

Р. Р. Рачев, М. И. Димитров, Е. Х. Филипова

ВЛИЯНИЕ ТРИЙОДТИРОНИНА И ICl НА СИНТЕЗ БЕЛКА В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

Центральная биофизическая лаборатория, Болгарская Академия Наук, София

Ионы йода *in vitro* оказывают тироксинподобное действие на включение L - ^{14}C -лейцина в белки изолированных митохондрий и микросом тиреоидэктомированных крыс. Тироксин, трийодтиронин (T_3) и ICl повышают включение L - ^{14}C -лейцина *in vitro* в белки изолированных митохондрий тиреоидэктомированных осивотных, но не влияют на синтез белка в микросомах. Рифампицин и оливомицин полностью снимают стимулирующий эффект T_3 и ICl на включение меченой аминокислоты в белки митохондрий. Тиреоидные гормоны и ионы йода *in vitro* стимулируют синтез белка в микросомах печени тиреоидэктомированных осивотных только после преинкубации их с митохондриями или ядрами. В этих условиях преинкубация с митохондриями повышает скорость включения L - ^{14}C -лейцина в белки микросом в 2—2,5 раза, а с ядрами — в 4—4,8 раза. Тиреоидные гормоны и ионы йода стимулируют *in vitro* синтез специфических факторов в митохондриях (МБС) и ядрах (ЯБС) печени тиреоидэктомированных крыс; эти факторы в свою очередь ускоряют синтез белка в изолированных микросомах. Для синтеза МБС- и ЯБС-факторов необходимо присутствие всех четырех

рибозотрифосфатов (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ), синтез указанных факторов полностью ингибируется оливомицином. Рифампицин блокирует только синтез МБС-фактора. Предполагается, что ЯБС- и МБС-факторы представляют собой РНК (иРНК), синтезированные в ядрах или митохондриях, которые транспортируются в инкубационную среду и транслируются рибосомами.

Тиреоидные гормоны играют важную роль в регуляции синтеза белка в организме животных. Введение их тиреоидэктомированным животным восстанавливает скорость синтеза белка в митохондриях и микросомах различных органов [1—3]. Найдено, что тиреоидные гормоны стимулируют *in vitro* включение меченых аминокислот в белки митохондрий печени [4—6], не изменяя в них величины аминокислотного пула [4]. Механизмы действия тиреоидных гормонов на синтез белка неясны. Имеются данные, что гормоны щитовидной железы осуществляют свое первичное влияние на митохондрии, в которых синтезируется неидентифицированный фактор, далее стимулирующий синтез белка в цитоплазме [7, 8]. Найдено, однако, что тиреоидные гормоны стимулируют активность РНК-полимеразы [9, 10] и что в ядрах находятся специфические рецепторы для тироксина и трийодтиронина, являющиеся негистоновыми белками, связанными с ДНК [11, 12]. Рецепторы для тиреоидных гормонов найдены также в митохондриях [13] и в цитозоле [14]. Мало известно о метаболически активной форме тиреоидных гормонов. В экспериментах с изолированными митохондриями [15—17] и некоторыми энзиматическими системами [17—19] обнаружено, что ионы йода обладают теми же свойствами, что и тиреоидные гормоны. Некоторые авторы предполагают, что гормоны щитовидной железы могут реализовать свой биологический эффект на молекулярном уровне с помощью ионов йода после их освобождения при дейодировании [20—22]. Дейодаза найдена во всех субклеточных частицах [23, 24].

В настоящей работе исследовалось влияние *in vitro* трийодтиронина (T_3), тироксина (T_4), I_2 и ICl на включение $L-^{14}C$ -лейцина в белки митохондрий и микросом, изолированных из печени тиреоидэктомированных крыс.

Методы исследования

Подготовка животных и выделение субклеточных фракций. Эксперименты проводили на 20—25-дневных самцах белых крыс, тиреоидэктомированных или ложнооперированных (контроль). Тиреоидэктомии проводили хирургическим путем за 10 дней до опыта. Печень декаптитированных животных гомогенизировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,05 М KCl , 0,01 М $MgCl_2$, 0,05 М трис- HCl (рН 7,6). Для выделения ядер гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 600 g. Осадок обрабатывали 0,1% раствором тритона X-100 и центрифугировали в 1 М растворе сахарозы, как описано [25]. Митохондрии выделяли из постядерного супернатанта центрифугированием при 8500 g за 10 мин. Митохондрии трижды промывали средой изоляции. Микросомы получали из постмитохондриального супернатанта, центрифугируя его в течение 1 ч при 105 000 g.

Включение аминокислот в белки. Использовали стандартную инкубационную среду [26] с незначительными модификациями, содержащую 50 мМ трис- HCl (рН 7,6), 0,154 М KCl , 10 мМ $MgCl_2$, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ фосфатного буфера (рН 7,6), 2 мМ смеси рибозотрифосфатов (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ), 30 мМ сукцината натрия, 26 мкМ креатинфосфата, 0,2 мг креатинкиназы, 22,5 мкг/мл полной аминокислотной смеси, за исключением лейцина, 1 мкКи $L-^{14}C$ -лейцина (удельная радиоактивность 125 мКи/ммоль) и около 4 мг митохондриального или микросомального белка. Общий объем проб 2,0 мл. Тиреоидные гормоны (T_3 или T_4), I_2 или ICl добавляли в пробы в конечной концентрации 50 мкМ, оливомицин или рифампицин — 100 мкг/мл. Пробы инкубировали в аэробных условиях на водяной бане при 37°C и непрерывном взбалтывании. Через 30, 60, 120 или 180 мин после начала инкубации отбирали по 0,5 мл для анализа. Реакции прекращали добавлением 10% раствора холодной ТХУ. Для определения радиоактивности белка осадок суспендировали в 5% растворе ТХУ, прогревали при 90° в течение 30 мин и экстрагировали последовательно в смеси спирта и эфира (1 : 1), а затем эфиром при 37° [27].

Количество белка в пробах определяли по методу Лоури [28]. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике Packard Tricarb Scintillation Spectrometer, model 3320, используя сцинтилляционную жидкость, содержащую диоксан, POP, POPOP и нафталин. Результаты рассчитывали в импульсах на 1 мин на 1 мг белка. Поскольку микросомы не обладают собственным аминокислотным пулом, можно считать, что включение меченой аминокислоты в белки микросом отражает процесс синтеза в них белка.

Результаты

Влияние тиреоидных гормонов и ионов йода *in vitro* на включение L-¹⁴C-лейцина в белки изолированных митохондрий. Действие T₃, T₄, I₂ и ICl *in vitro* на использование L-¹⁴C-лейцина для синтеза белка в митохондриях, изолированных из печени ложнооперированных или тиреоидэктомированных животных, отражено на рис. 1. Видно, что включение меченой аминокислоты в белки митохондрий печени тиреоидэктомированных крыс почти в 2 раза ниже, чем у ложнооперированных животных. Добавление к инкубационной среде T₃ или T₄ полностью восстанавливает скорость включения радиоактивного предшественника. Стимулирующий эффект гормонов

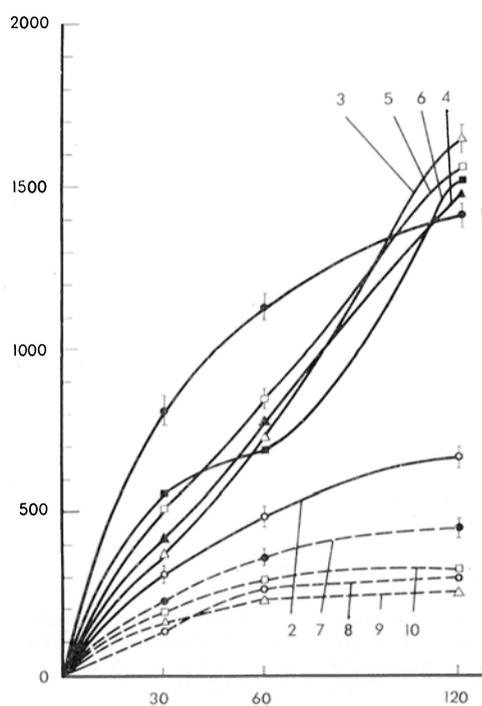


Рис. 1. Влияние T₃, T₄, I₂ и ICl *in vitro* на включение L-¹⁴C-лейцина в белки митохондрий печени.

1 — контроль, ложнооперированные крысы (К); 2 — тиреоидэктомированные крысы (Т₀); 3 — Т₀ + T₃; 4 — Т₀ + T₄; 5 — Т₀ + ICl; 6 — Т₀ + I₂; 7 — К + рифампицин; 8 — Т₀ + рифампицин; 9 — Т₀ + T₃ + рифампицин; 10 — Т₀ + ICl + рифампицин. Здесь и на рис. 2—12: по оси ординат — радиоактивность (в имп/мин на 1 мг белка); по оси абсцисс — время инкубации (в мин).

контрольных, ложнооперированных животных, достигается после 90 мин инкубации. Добавление к инкубационной среде I₂ или ICl также нормализует включение меченого лейцина в белки митохондрий печени тиреоидэктомированных крыс, причем их эффект проявляется раньше, чем действие тиреоидных гормонов.

Рифампицин, являющийся специфическим ингибитором митохондриальной ДНК-зависимой РНК-полимеразы [8, 29], и оливомицин, ингибирующий синтез РНК [30], полностью снимают стимулирующее действие T₃ или ICl (см. рис. 1 и 2). Они резко ингибируют процесс включения L-¹⁴C-лейцина в белки митохондрий печени ложнооперированных и тиреоидэктомированных животных.

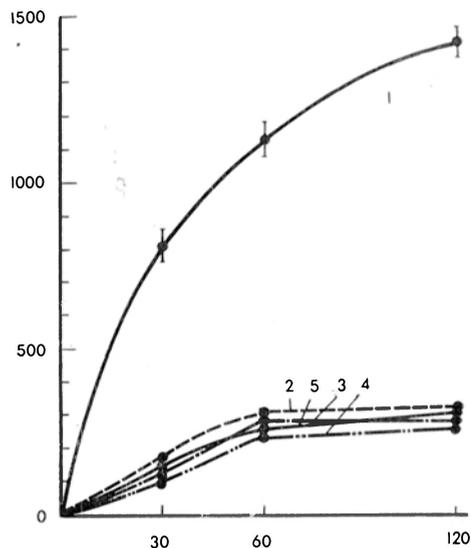


Рис. 2. Влияние оливомицина *in vitro* на скорость включения L-¹⁴C-лейцина в белки изолированных митохондрий печени.

1 — контроль, ложнооперированные крысы (К); 2 — К + оливомицин; 3 — тиреоидэктомированные животные (Т₀) + оливомицин; 4 — Т₀ + T₃ + оливомицин; 5 — Т₀ + ICl + оливомицин.

проявляется в начальный период инкубации медленно. Лишь через 60 мин инкубации включение ¹⁴C-лейцина в белки митохондрий тиреоидэктомированных крыс под влиянием T₃ и T₄ заметно повышается уровень, характерный для

Скорость включения меченого предшественника в белки митохондрий в значительной степени зависит также и от наличия в инкубационной среде всех четырех рибозотрифосфатов (АТФ, ГТФ, УТФ и ЦТФ). Отсутствие УТФ и ЦТФ резко снижает скорость включения радиоактивной аминокислоты и устраняет стимулирующий эффект T_3 и ICl (рис. 3).

Результаты, полученные в опытах с пробами, в которых присутствовали рифампицин или оливомидин (см. рис. 1 и 2) или отсутствовали ЦТФ и УТФ (см. рис. 3), необходимые для синтеза митохондриальной РНК, указывают на то, что тиреоидные гормоны и ионы йода стимулируют включение меченых аминокислот в белки митохондрий, по всей вероятности, действуя на механизмы, связанные с процессом транскрипции в них.

Влияние тиреоидных гормонов и ионов йода in vitro на включение меченого $L\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцина в белки микросом. Результаты опытов по определению

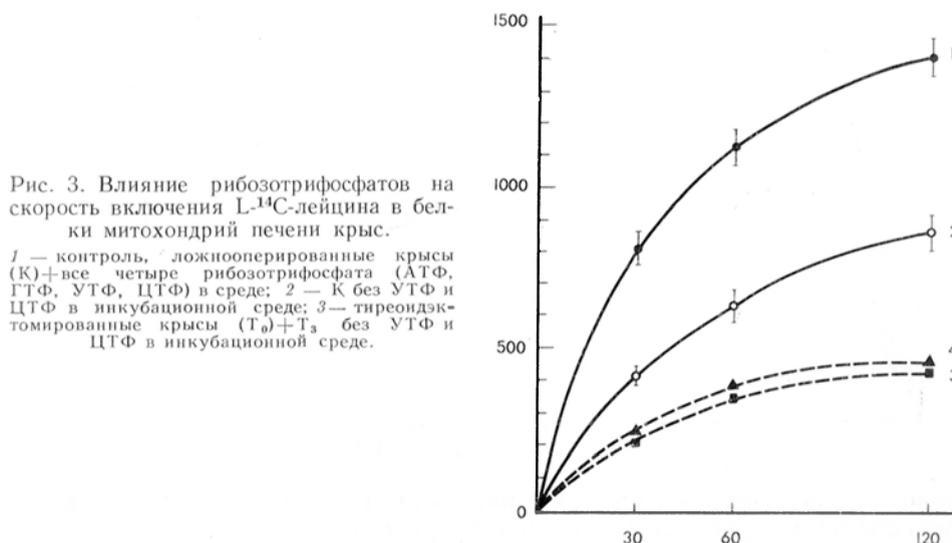


Рис. 3. Влияние рибозотрифосфатов на скорость включения $L\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцина в белки митохондрий печени крысы.

1 — контроль, ложнооперированные крысы (К) + все четыре рибозотрифосфата (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ) в среде; 2 — К без УТФ и ЦТФ в инкубационной среде; 3 — тиреоидэктомированные крысы (T_0) + T_3 без УТФ и ЦТФ в инкубационной среде.

влияния T_3 , T_4 , I_2 или ICl *in vitro* на скорость включения радиоактивного лейцина в белки изолированных микросом печени экспериментальных животных представлены на рис. 4. Из графиков видно, что тиреоидные гормоны и ионы йода, добавленные к инкубационной среде, не оказывают влияния на включение меченой аминокислоты в белки изолированных из печени тиреоидэктомированных крыс микросом. Скорость включения ^{14}C -лейцина в белки микросом печени тиреоидэктомированных животных как при наличии в среде инкубации, так и при отсутствии в ней T_3 , T_4 , I_2 или ICl оставалась в 2 раза ниже, чем в микросомах контрольных животных. Полученные результаты совпадают с данными других авторов [31, 32]. В этом отношении микросомы отличаются от митохондрий (см. рис. 1).

Отсутствие *in vitro* влияния тиреоидных гормонов и ионов йода на синтез белка в микросомах тиреоидэктомированных животных привело к тому, что микросомальная фракция клеток печени тиреоидэктомированных крыс стала хорошей моделью для изучения места их первичного эффекта на субклеточном уровне и в реакциях синтеза белка в клетке. Для этой цели были проведены эксперименты, в которых микросомы, изолированные из печени животных с удаленной цитовидной железой, в различных вариантах комбинировали с митохондриями или ядрами. Результаты таких вариантов опытов описаны ниже.

Роль митохондрий в реализации эффекта тиреоидных гормонов и ионов йода на синтез белка in vitro в микросомах. Серия опытов по изучению роли митохондрий в реализации эффекта тиреоидных гормонов и ионов йода на синтез белка в микросомах была выполнена в двух вариантах. Микросомальную функцию из печени тиреоидэктомированных крыс преинкубиро-

вали совместно с митохондриями из печени контрольных (ложнооперированных) или тиреоидэктомированных животных.

Вариант 1. Микросомы из печени тиреоидэктомированных крыс преинкубировали с митохондриями, изолированными из печени ложнооперированных или тиреоидэктомированных крыс, в течение 60 мин при 37° в стандартной инкубационной среде с добавкой T₃ или ICl и в отсутствие ¹⁴C-лейцина. После этого пробы центрифугировали при 8500 g в течение 10 мин для отделения митохондрий. К микросомальному супернатанту добавляли

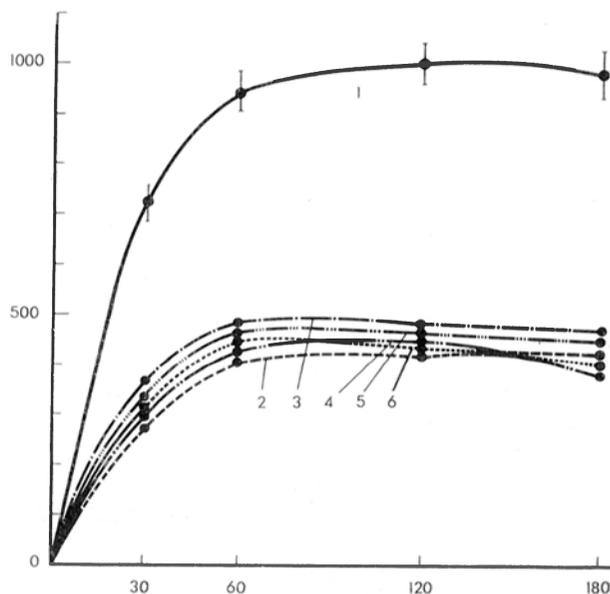


Рис. 4. Влияние T₃, T₄, I₂ и ICl in vitro на включение L-¹⁴C-лейцина в белки изолированных микросом печени крыс.

1 — контроль, ложнооперированные крысы (К); 2 — тиреоидэктомированные крысы (T₀); 3 — T₀+T₄; 4 — T₀+T₃; 5 — T₀+I₂; 6 — T₀+ICl.

радиоактивный лейцин и проводили инкубацию в описанных выше условиях в течение 180 мин. Пробы для анализа брали через 30, 60, 120 или 180 мин после начала инкубации. В контрольных пробах микросомы преинкубировали в присутствии T₃ или ICl, но в отсутствие митохондрий. Полученные результаты представлены на рис. 5. Видно, что микросомы печени тиреоидэктомированных крыс, преинкубированные с митохондриями печени ложнооперированных животных, включают L-¹⁴C-лейцин 2½ раза интенсивнее, чем микросомы, преинкубированные в отсутствие митохондрий. Митохондрии, изолированные из печени тиреоидэктомированных крыс при тех же условиях, повышают синтез белка в микросомах только на 50%. Однако при аналогичных условиях добавление T₃ или ICl к инкубационной среде приводит к полной нормализации скорости синтеза белка в изолированных микросомах печени тиреоидэктомированных животных.

Добавление рифампицина (рис. 6) в среду полностью снимает стимулирующий эффект тиреоидных гормонов и ионов йода. Аналогичные результаты получаются и при отсутствии в инкубационной среде УТФ и ЦТФ, являющихся субстратами для синтеза РНК (рис. 7). Эти результаты указывают на то, что, вероятно, в митохондриях печени во время преинкубации синтезируется фактор, который выделяется в среду и стимулирует in vitro синтез белка в микросомах печени тиреоидэктомированных животных. Этот митохондриальный белок-стимулирующий фактор мы обозначили МБС-фактор.

МБС-фактор синтезируется изолированными митохондриями печени как ложнооперированных, так и тиреоидэктомированных крыс, а добавление T₃ или ICl in vitro стимулирует его синтез. Влияние T₃ и ICl на синтез МБС-фактора в значительной степени зависит также от рифампицина и от наличия в преинкубационной среде всех четырех рибозотрифосфатов (АТФ,

УТФ, ГТФ, ЦТФ). Чтобы продемонстрировать возможность выделения МБС-фактора из митохондрий в среду и перенос его к микросомам, обратимся к результатам опытов второго варианта.

Вариант 2. Митохондрии печени тиреоидэктомированных животных преинкубировали в течение 60 мин при 37°C в стандартной инкубационной среде при наличии T_3 или ICl , но в отсутствие микросом. После преинкубации митохондрии осаждали с помощью центрифугирования при 8500 g в течение 10 мин. К супернатанту, содержащему предполагаемый МБС-фактор, добавляли микросомы из печени тиреоидэктомированных крыс и $L-^{14}C$ -лейцин и инкубировали при тех же условиях, что и в первом варианте. Полученные результаты представлены на рис. 8; они показывают, что и в этом варианте включение ^{14}C -лейцина в белки изолированных микросом печени тиреоидэктомированных крыс в 2 раза выше, чем в микросомах, преинкубированных без митохондрий. Из полученных результатов видно, что МБС-фактор, синтезируемый в митохондриях, транспортируется через митохондриальную мембрану в инкубационную среду и, взаимодействуя с микросомами, стимулирует синтез белка в них. Из сказанного выше становится ясно, что митохондрии активно участвуют в реализации влияния тиреоидных гормонов и ионов йода на реакции синтеза белка, протекающие как в митохондриях, так и в цитоплазме, и что информация из митохондрий транслируется в микросомах.

Роль клеточных ядер в реализации влияния T_3 и ICl на синтез белка в микросомах *in vitro*. Для исследования роли клеточных ядер в реализации влияния тиреоидных гормонов и ионов йода *in vitro* на синтез белка в микросомах тиреоидэктомированных крыс были проведены три варианта экспериментов.

Вариант 1. Изолированные микросомы и ядра печени тиреоидэктомированных крыс преинку-

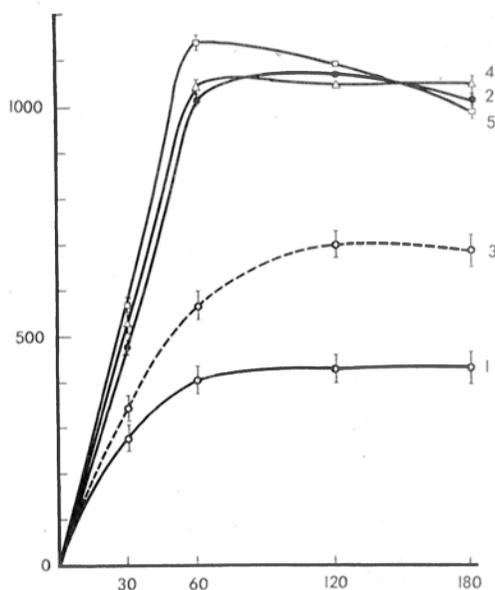


Рис. 5. Роль митохондрий в реализации влияния тиреоидных гормонов и ионов йода на синтез белка в микросомах *in vitro*. 1-й вариант постановки экспериментов.

1 — микросомы из печени тиреоидэктомированных крыс ($Mc T_0$) инкубированы без митохондрий; 2 — $Mc T_0$ инкубированы с митохондриями печени ложнопериоперированных животных; 3 — $Mc T_0$ инкубированы с митохондриями печени тиреоидэктомированных крыс ($Mx T_0$); 4 — $Mc T_0 + Mx T_0 + T_3$; 5 — $Mc T_0 + Mx T_0 + ICl$.

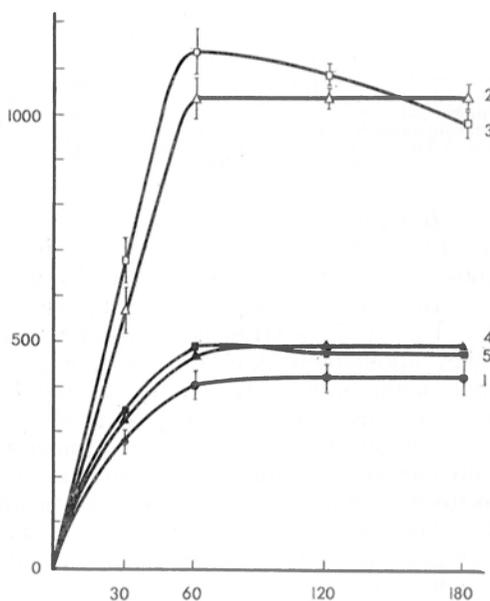


Рис. 6. Влияние рифампицина на стимулирующее действие митохондрий, T_3 и ICl на синтез белка в изолированных микросомах. 1 — $Mc T_0$ инкубированы без митохондрий; 2 — $Mc T_0 + Mx T_0 + T_3$; 3 — $Mc T_0 + Mx T_0 + ICl$; 4 — $Mc T_0 + Mx T_0 + T_3$ + рифампицин; 5 — $Mc T_0 + Mx T_0 + ICl$ + рифампицин.

бировавали в течение 60 мин в присутствии T_3 , T_4 или ICI. Ядра отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 600 g. К супернатанту, содержащему микросомы, добавляли $L\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцин и инкубировали в течение 180 мин. В контрольных пробах микросомы преинкубировали без ядер в присутствии T_3 , T_4 или ICI.

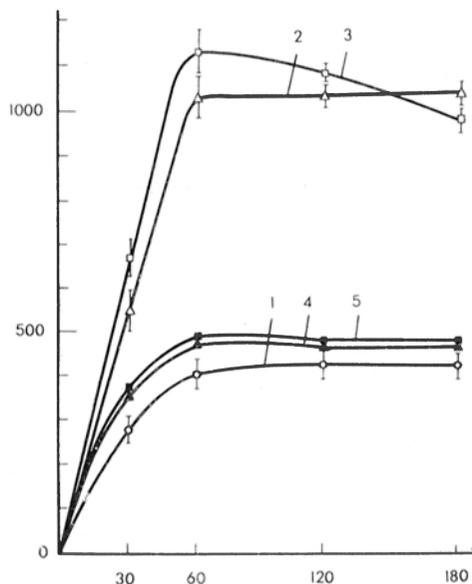


Рис. 7. Влияние присутствия рибозотрифосфатов на стимулирующее действие митохондрий, T_3 и ICI на синтез белка в изолированных микросомах печени тиреоидэктомированных крыс.

1 — Mc $T_0 + T_3$ инкубированы без митохондрий; 2 — Mc $T_0 + Mx$ $T_0 + T_3$ + четыре рибозотрифосфата; 3 — Mc $T_0 + Mx$ $T_0 + T_3$ + ICI + четыре рибозотрифосфата; 4 — Mc $T_0 + Mx$ $T_0 + T_3$ без УТФ и ЦТФ; 5 — Mc $T_0 + Mx$ $T_0 + T_3$ без УТФ и ЦТФ.

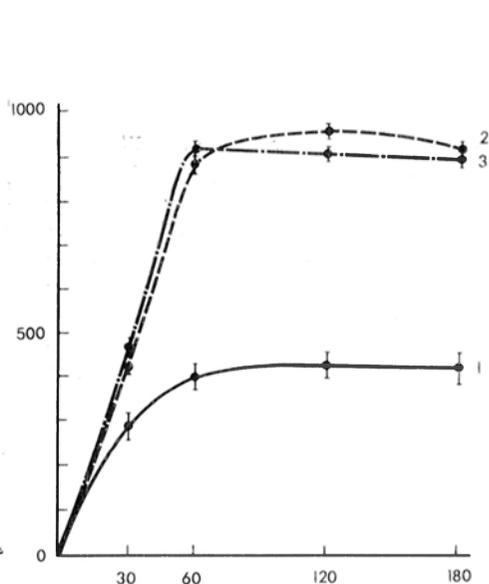


Рис. 8. Влияние МБС-фактора на синтез белка в изолированных микросомах печени тиреоидэктомированных крыс. 2-й вариант постановки экспериментов: митохондрии преинкубированы без микросом.

1 — контроль, Mc $T_0 + T_3$ или ICI; 2 — Mc $T_0 + T_3$ + МБС-фактор, синтезированный в присутствии T_3 ; 3 — Mc $T_0 + T_3$ + МБС-фактор, синтезированный в отсутствие ICI.

Вариант 2. Клеточные ядра из печени тиреоидэктомированных крыс преинкубировали с T_3 , T_4 или ICI, затем осаждали, а к супернатанту добавляли $L\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцин и микросомы.

Вариант 3. Микросомы преинкубировали с ядрами в присутствии T_3 , T_4 или ICI, затем после осаждения ядер микросомы изолировали центрифугированием при 105 000 g в течение 1 ч и инкубировали в свежей инкубационной среде в присутствии $L\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцина. Полученные результаты всех этих опытов отражены на рис. 9—12.

Микросомы печени тиреоидэктомированных крыс включают ^{14}C -лейцин слабее, чем микросомы, преинкубированные вместе с ядрами тиреоидэктомированных крыс и в 4 раза медленнее по сравнению с микросомами, которые были преинкубированы с ядрами клеток печени ложнооперированных животных (вариант 1, см. рис. 9). Из приведенных данных видно, что ядра клеток печени как ложнооперированных, так и тиреоидэктомированных животных способны стимулировать синтез белка в изолированных микросомах, но потенциальные возможности вторых резко ограничены (см. рис. 9). Однако стимулирующее влияние ядер клеток печени тиреоидэктомированных крыс на синтез белка в микросомах вполне восстанавливается при наличии в среде инкубации тиреоидных гормонов или ионов йода.

Фактор, синтезирующийся в ядрах и стимулирующий синтез белка в микросомах, мы обозначили как ядерный белокстимулирующий фактор (ЯБС-фактор). Синтез этого фактора *in vitro*, а может быть и *in vivo*, контролируется тиреоидными гормонами, причем стимулирующее влияние

Рис. 9. Роль клеточных ядер в реализации влияния T_3 , T_4 и ICI на синтез белка в изолированных микросомах печени тиреоидэктомированных крыс. 1-й вариант постановки экспериментов.

1 — Mc T_0 инкубированы без ядер; 2 — Mc T_0 + ядра ложнооперированных крыс; 3 — Mc T_0 + ядра тиреоидэктомированных крыс (Яд T_0); 4 — Mc T_0 + Яд T_0 + T_3 ; 5 — Mc T_0 + Яд T_0 + T_4 ; 6 — Mc T_0 + Яд T_0 + ICI.

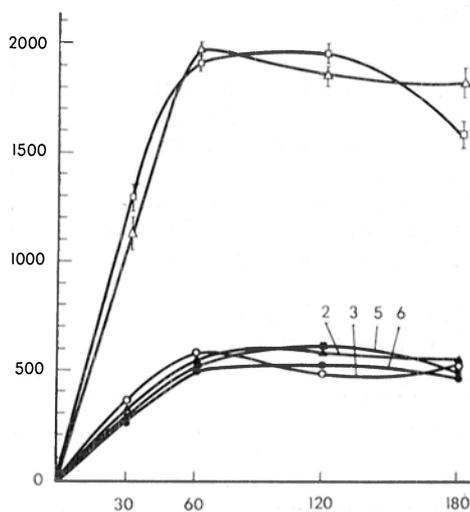
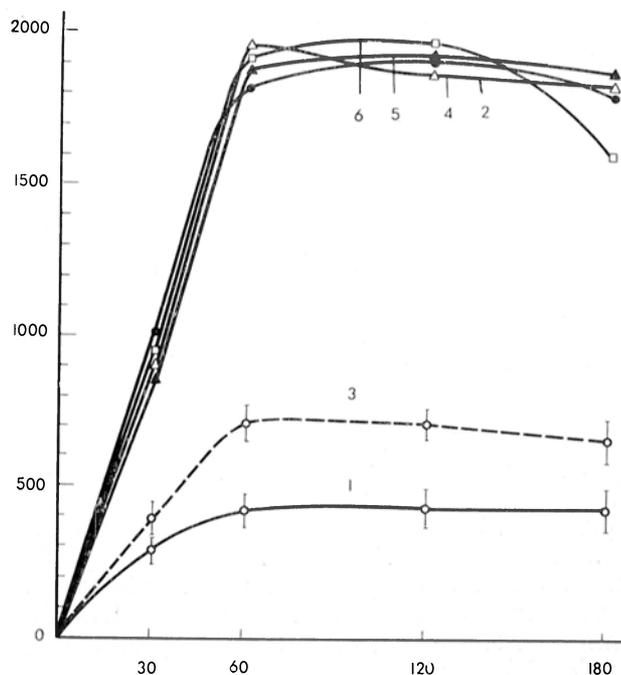


Рис. 10. Влияние оливомицина и рибозотрифосфатов на стимулирующее действие ЯБС-фактора на синтез белка в микросомах *in vitro*.

1 — Mc T_0 + Яд T_0 + T_3 ; 2 — Mc T_0 + Яд T_0 + T_3 без УТФ и ЦТФ в среде; 3 — Mc T_0 + Яд T_0 + T_3 + оливомицин; 4 — Mc T_0 + Яд T_0 + ICI; 5 — Mc T_0 + Яд T_0 + ICI без УТФ и ЦТФ в среде; 6 — Mc T_0 + Яд T_0 + ICI + оливомицин.

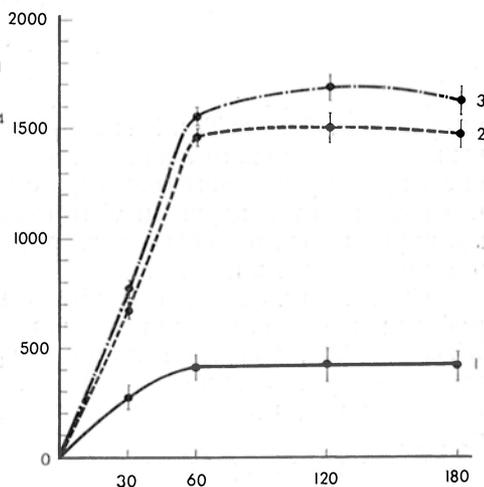


Рис. 11. Эффект свободного ЯБС-фактора на синтез белка в изолированных микросомах печени тиреоидэктомированных крыс. 2-й вариант постановки экспериментов.

1 — Mc T_0 + T_3 (или ICI) без ЯБС-фактора, контроль; 2 — Mc T_0 + ЯБС-фактор, синтезированный в присутствии T_3 ; 3 — Mc T_0 + ЯБС-фактор, синтезированный в присутствии ICI.

T_3 , T_4 или ICI на синтез ЯБС-фактора проявляется только при наличии в среде всех четырех рибозотрифосфатов (см. рис. 10). Оливомицин, добавленный к инкубационной среде, снимает стимулирующее действие тирео-

идных гормонов и ICl на синтез ЯБС-фактора и стимулирующее действие гормонов и ICl на синтез белка в микросомах (см. рис. 10). Эти наблюдения дают основание думать, что ЯБС-фактор представляет собой и РНК, которая транскрибируется в ядрах и транслируется в микросомах.

ЯБС-фактор, как и МБС-фактор, сравнительно стабилен и его стимулирующее действие на синтез белка в микросомах наблюдается в течение

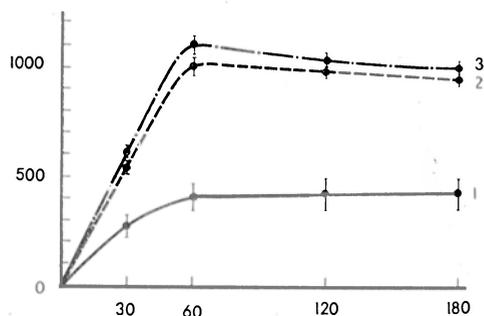


Рис. 12. Влияние связанного ЯБС-фактора на синтез белка в микросомах, изолированных из печени тиреоидэктомированных крыс. 3-й вариант постановки экспериментов.

1 — Ms T₀ преинкубированы без ядер; 2 — Ms T₀ + Яд T₀ + T₃; 3 — Ms T₀ + Яд T₀ + ICl.

180 мин инкубации. ЯБС-фактор, синтезирующийся в ядрах, транспортируется в инкубационную среду, где относительно прочно связывается с микросомами и осаждаётся с ними при центрифугировании (см. рис. 11, вариант 2). Это хорошо видно из результатов, полученных в 3-м варианте экспериментов (см. рис. 12). ЯБС-фактор более заметно стимулирует синтез белка в микросомах, чем МБС-фактор. Эти различия, вероятно, связаны либо с более активным синтезом ЯБС-фактора по сравнению с МБС-фактором, или с тем, что он более эффективно утилизируется рибосомами, чем МБС-фактор.

Обсуждение

Тиреоидные гормоны и ионы йода *in vitro* в 2—2^{1/2} раза повышают скорость включения L-¹⁴C-лейцина в белки изолированных митохондрий печени тиреоидэктомированных крыс, но не влияют на синтез белка в микросомах. Однако T₃ и ICl в 3^{1/2}—4 раза увеличивают интенсивность включения радиоактивного лейцина в белки изолированных микросом, если они были преинкубированы совместно с митохондриями или ядрами. Найдено, что ядра и митохондрии *in vitro* синтезируют факторы (ЯБС и МБС), стимулирующие синтез белка в изолированных микросомах печени тиреоидэктомированных животных.

Синтез этих факторов *in vitro* стимулируется T₃ и ICl и ингибируется рифампицином, оливомицином или удалением из инкубационной среды УТФ и ЦТФ. Первые являются ингибиторами РНК-полимеразы [8], а вторые — субстратами синтеза РНК. Эти данные представляют возможность предположить, что ЯБС- и МБС-факторы являются РНК, по-видимому, и РНК.

В наших неопубликованных экспериментах установлено, что изолированные митохондрии печени тиреоидэктомированных крыс, которым однократно вводили T₃ или ICl, включают *in vitro* ³H-УТФ в митохондриальную РНК более чем в 2 раза активнее, чем митохондрии контрольных животных. Подобный эффект T₃ и ICl наблюдается и в опытах *in vitro* при включении ¹⁴C-оротовой кислоты в РНК субклеточных фракций печени тиреоидэктомированных крыс.

Механизм, с помощью которого тиреоидные гормоны и ионы йода «унифицируют» свое стимулирующее влияние на синтез белка, пока не ясен. Можно предположить, что либо тиреоидные гормоны на субклеточном и молекулярном уровне освобождают ионы йода, реализующие эффекты гормона, либо как ионы йода, так и интактные молекулы трийодтиронина осуществляют свой эффект как самостоятельные действующие факторы. В пер-

вом случае возможно, что T_3 и T_4 , связываясь с рецепторными белками, передают им часть ионов йода, микромодифицируя структуру этих белков. Во втором случае ионы йода и интактной молекулы тиреоидных гормонов связываются с одним и тем же рецепторным местом в ядрах и митохондриях и, йодируя их, вызывают аналогичный эффект. В этом случае можно было бы ожидать, что ионы йода и T_3 (T_4) будут конкурировать за связь с общим рецепторным местом.

В наших опытах (неопубликованные данные) найдено, что ICl , подобно немеченому T_3 *in vivo* и *in vitro*, в одинаковой степени конкурирует с ^{125}I -трийодтиронином за связывание с белками ядер и митохондрий.

Поскольку йодируются в основном тирозилвые и гистидилвые остатки белка [33, 34], можно предполагать, что именно эти фрагменты белковой молекулы представляют собой рецепторные места для тиреоидных гормонов и ионов йода. Взаимодействие T_3 и T_4 с рецепторами является высокоспецифичной реакцией, тогда как связывание ионов йода, по-видимому, менее специфично и иногда протекает с нежелательными побочными эффектами. Тем не менее взаимодействие ионов йода с рецепторными белками в хроматине печени тиреоидэктомированных животных, по всей вероятности, может вызывать эффекты, аналогичные тем, которые дают T_3 и T_4 . Йодирование хроматиновых белков, вероятно, может играть важную роль в регуляции стабильности связи между ДНК и ассоциированными с ней белками. Так, показано [35, 36], что богатые тирозином пептиды активно взаимодействуют с ДНК, стабилизируя ее структуру. Йодирование этих пептидов полностью снимает их стабилизирующее действие на ДНК [37].

Существует предположение, что тирозилвые остатки в молекуле λ с репрессорного белка интеркалируют между основаниями ДНК [38, 39] и таким образом создают связь между репрессором и оператором [40]. Этим объясняется блокирование процесса транскрипции. При взаимодействии эффекторов с репрессором в его молекуле возникают конформационные изменения, ответственные за процесс индукции [40, 41]. В этих конформационных изменениях, по-видимому, определенная роль принадлежит тирозилвым остаткам, находящимся в NH_2 -концах молекулы λ с репрессора [40, 42, 43].

Вполне вероятно, что йодирование тирозилвых остатков в репрессорном белке нарушает условия интеркаляции с основаниями ДНК, а вместе с тем и его репрессирующую функцию.

Известно, что ряд ингибиторов транскрипции действует по принципу интеркалирования между соседними парами оснований ДНК, это препятствует ее связыванию с РНК-полимеразой и блокирует инициацию транскрипции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stein O., Gross J. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1962, v. 109, p. 817.
2. Freeman K. B., Roodyn D. B., Tata J. R. — Biochim. biophys. Acta, 1963, v. 72, p. 129.
3. Roodyn D. B., Freeman K. B., Tata J. R. — Biochem. J., 1965, v. 94, p. 628.
4. Buchanan J., Primack M. P., Tapley D. F. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 222, p. 536.
5. Primack M. P., Tapley D. F., Buchanan J. — Ibid., 1971, v. 244, p. 349.
6. Primack M. P., Tapley D. F., Buchanan J. — Endocrinology, 1972, v. 91, p. 840.
7. Sokoloff L. — In: Regulatory Mechanisms for Protein Synthesis in Mammalian Cells, Ed. A. San Pietro, M. R. Lanber, F. T. Kenney. New York, 1968, p. 345.
8. Sokoloff L., Roberts P. A. — J. biol. Chem., 1974, v. 249, p. 5520.
9. Tata J. R., Widnell C. C. — Biochem. J., v. 98, p. 604.
10. Gadaleta M. N., Di Reda N., Bove G. et al. — Europ. J. Biochem., 1975, v. 51, p. 495.
11. Oppenheimer J. H., Schwartz H. L., Koerner D. et al. — J. clin. Invest., 1974, v. 53, p. 768.
12. Surks M. I., Koerner D., Dillman W. et al. — J. biol. Chem., 1973, v. 248, p. 7066.
13. Tata J. R. — Nature, 1975, v. 257, p. 18.
14. Dillman W., Surks M. I., Oppenheimer J. H. — Endocrinology, 1974, v. 95, p. 492.
15. Rall J. E., Michel R., Roche J. et al. — J. biol. Chem., 1963, v. 238, p. 1848.
16. Rachev R. R., Dimitrov O. A., Philipova E. H. et al. — J. Bioenerg., 1973, v. 5, p. 17.
17. Varrone S., Consiglio E., Covelli I. — Europ. J. Biochem., 1970, v. 13, p. 305.
18. Jolin T. et al. — Bio-

chem. J., 1971, v. 125, p. 869. — 19. Колотилова А. И., Кудрявцева Г. В., Рачев Р. Р. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1974, № 2, с. 155. — 20. Galton V. A., Ingbar S. H. — *Endocrinology*, 1962, v. 70, p. 622. — 21. Рачев Р. Р. Окислительное фосфорилирование в митохондриях и тиреоидные гормоны. Докт. дис. Л., 1969. — 22. Grunstein E., Wynn J. — *J. theor. Biol.*, 1970, v. 26, p. 343. — 23. Albright E. C., Tomita K., Larson A. — *Endocrinology*, 1959, v. 64, p. 208. — 24. Yamazaki E., Slingerlang D. W. — *Ibid.*, 1959, v. 64, p. 126. — 25. Dabeva M. D., Tsanev R. G. — *Analyt. Biochem.*, 1966, v. 17, p. 390. — 26. Beattie D. S., Basford R. E., Koritz S. B. — *Biochemistry (Wash.)*, 1967, v. 6, p. 3099. — 27. Rabson R., Novelli G. D. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1960, v. 46, p. 484. — 28. Lowry O. H., Rosebrough N., Farr A. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 139, p. 265. — 29. Shmerling Z. G. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1969, v. 37, p. 965. — 30. Gause G. G., Loshkareva N. P., Zbarsky I. B. — *Biochim. biophys. Acta*, 1968, v. 166, p. 752. — 31. Litman D. J., Cantor C. R. — *Biochemistry (Wash.)*, 1974, v. 13, p. 512. — 32. Michalski C. J., Sells B. H. — *Europ. J. Biochem.*, 1974, v. 49, p. 361. — 33. Covelli I., Wolff J. — *J. biol. Chem.*, 1966, v. 241, p. 4444. — 34. Wasserman P. M., Kaplan N. O. — *Ibid.*, 1968, v. 243, p. 720. — 35. Novak R. L., Dohnal J. — *Nature. New Biol.*, 1973, v. 243, p. 155. — 36. Novak R. L., Dohnal J. — *Nucl. Acids Res.*, 1974, v. 1, p. 753. — 37. Novak R. L., Dohnal J. — *Ibid.*, p. 761. — 38. Dimicoli J. L., Helene C. — *Biochemistry (Wash.)*, 1974, v. 13, p. 724. — 39. Gabbay E. J., Sanford K., Baxter C. S. et al. — *Ibid.*, 1973, v. 12, p. 4021. — 40. Bourgeois S., Pfahe M. — *Advanc. Protein Chem.*, 1976, v. 30, p. 11. — 41. Laiken S. L., Gross C. A., von Hippel P. H. — *J. molec. Biol.*, 1972, v. 66, p. 143. — 42. Ohshima Y., Masuura M., Horiuchi T. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 47, p. 1444. — 43. Matthews K. S., Matthews H. R., Thielmann H. W. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 295, p. 159

Поступила 2/II 1978 г.

EFFECT OF TRIIODOTHYRONINE AND ICI ON PROTEIN SYNTHESIS IN CELL-FREE SYSTEM

R. R. Rachev, M. I. Dimitrov, E. Kh. Filipova

Central Laboratory of Biophysics, Academy of Sciences of Bulgaria, Sofia

Iodine ions exhibited the thyroxin-like effect on incorporation of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -leucine into proteins of isolated mitochondria and microsomes of thyroidectomized rats in vitro. Thyroxin, triiodothyronine (T_3) and ICI increased the incorporation of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -leucine into proteins of isolated mitochondria of thyroidectomized rats, but did not affect the protein synthesis in microsomes in vitro. Rifampycin and olivomycin abolished completely the stimulating effect of T_3 and ICI on incorporation of the label into mitochondrial proteins. The thyroid hormones and iodine ions stimulated protein synthesis in vitro in liver microsomes of thyroidectomized animals only after preincubation with mitochondria or nuclei. In these conditions preincubation with mitochondria elevated the rate of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -leucine incorporation into microsomal proteins 2-2.5-fold. In similar experiments with nuclei — 4-4.8-fold stimulation was detected. Thyroid hormones and iodine ions stimulated synthesis of specific factors in mitochondria (MBS) and in nuclei (NBS) of thyroidectomized rat liver tissue, which increased the protein synthesis in isolated microsomes in vitro. Synthesis of MBS- and NBS-factor required the presence of all the four ribosetriphosphates (ATP, GTP, UTP, CTP) and was inhibited completely by olivomycin; rifampycin blocked only the MBS factor synthesis. NBS- and MBS-factors appear to be RNA (mRNA), synthesized in nuclei and mitochondria, which are transported into the incubation media and translated by ribosomes.

УДК 616.36-006.6-092.9-085:[615.357.453 + 615.357.379]-07:616.36-008.931-074

Л. А. Кильдема

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗЫ И ГЛЮКОКИНАЗЫ К ГОРМОНАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ПРИ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Институт экспериментальной и клинической медицины Министерства здравоохранения Эстонской ССР, Таллин

Исследовали влияние гидрокортизона и инсулина на активность гексокиназы (ГК) ее изоферментов и глюкокиназы (ГЛК) при гепатоканцерогенезе, индуцированном у крыс диэтилнитрозамином. У нормальных крыс после 7-дневного введения гидрокортизона активность ГК снижалась на 25%, что происходило в основном за счет снижения

активности изофермента II. Активность ГЛК понижалась у молодых животных на 38%, а у более старых крыс — на 23%. Инсулин при 2-дневном введении не влиял на активность ГК, а активность ГЛК повышалась на 177%. При гепатоканцерогенезе влияние гидрокортизона на активность ГК (изофермента II ГК) и ГЛК заметно уменьшалось и с развитием опухолей становилось несущественным. Влияние инсулина на активность ГЛК при гепатоканцерогенезе не отличалось от его влияния на этот фермент в нормальной печени.

По современным представлениям, канцерогенез является многоступенчатым процессом, в ходе которого появляются признаки нерегулируемости обмена и роста. Гормоны принадлежат к контролирующим факторам, обеспечивающим постоянство внутренней среды организма и регулирующим синтез ферментных и изоферментных белков, поэтому изучение нарушений в этой регуляции при опухолевом росте представляет несомненный интерес.

Известно, что инсулин индуцирует синтез глюкокииназы (ГЛК), к его действию чувствителен также и изофермент II гексокиназы (ГК) [1—3]. Показано, что после введения глюкокортикоидов в печени понижается активность ГК и ГЛК [4—9].

В настоящей работе исследовали влияние гидрокортизона и инсулина на активность ключевых ферментов углеводного обмена — ГК и ГЛК — при гепатоканцерогенезе у крыс.

М е т о д и к а

Исследования проводили на крысах-самцах Вистар массой в начале опыта 160—200 г. Экспериментальной моделью был выбран гепатоканцерогенез, вызванный диэтилнитрозаминном (ДЭНА) — канцерогеном, обладающим органотропным действием на печень. ДЭНА вводили животным с питьевой водой по 2,5 мг на 1 кг массы в день 6 раз в неделю в течение 8 мес. Опыты с введением гормонов проводили в конце 3, 5, 6, 7 и 8-го месяца. Гидрокортизона ацетат (микрористаллический, фирма «Гедеон Рихтер», Венгрия) вводили внутримышечно в 1-й день в количестве 2,5 мг на 100 г массы, в следующие 6 дней — по 5 мг на 100 г массы. Инсулин вводили подкожно по 2 ЕД на 100 г массы 2 раза в день в течение 2 дней. За 17 ч до опыта крысы получали только воду.

Животных декапитировали, извлекали печень и отмывали 0,15 М КСl. Ткань печени гомогенизировали в среде, содержащей 0,05 М трис-HCl-буфер, 0,15 М КСl и 0,001 М ЭДТА pH 7,8. Гомогенат центрифугировали на холоду при 15 000 g в течение 20 мин. В полученной растворимой фракции (содержание белка в пробах 150—200 мкг) определяли активность ГК и ГЛК спектрофотометрически по скорости восстановления НАДФ [10]. Активность ГК и ГЛК выражали в микромолях НАДФ·Н на 1 мг белка за 60 мин (при 20—22°C). Белок определяли по методу Лоури.

Влияние гормонов исследовали также на изоферменты ГК. С этой целью гомогенат центрифугировали при 50 000 g в течение 60 мин. Изоферменты ГК выделяли хроматографически на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в градиенте концентрации КСl. Подробное описание определения активности ГК и ГЛК, а также выделения изоферментов ГК дано нами ранее [11]. Параллельно с биохимическими исследованиями проводили морфологическое исследование ткани печени в лаборатории механизмов канцерогенеза. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону и Маллори. Полученные результаты подвергали вариационно-статистической обработке (тест *t* Стьюдента).

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

По данным гистологического исследования, в первые месяцы введения ДЭНА в печени отмечалась ангулярная вакуолизация, что можно объяснить токсическим действием канцерогена. Начиная с 3-го месяца у части животных, а с 4-го месяца у всех крыс обнаруживалась очаговая гиперплазия, которая была выражена еще более в конце 5-го месяца. В этот период, кроме очаговой и узловой гиперплазии, у половины крыс были найдены единичные узелки (диаметром 1—2 мм) высококодифференцированных гепатом. В конце 6-го и особенно 7-го месяца гиперпластические изменения уменьшались и в печени можно было обнаружить опухолевые узлы и гепатомы диаметром до 3—4 мм, часть из которых сливалась и образовывала крупные конгломераты. Через 8 мес у некоторых крыс отмечались узелки высококодифференцированных гепатокарцином, у большинства же животных

имелись более обширные опухолевые образования диаметром 2—5 мм, реже до 10 мм, образующие иногда крупные конгломераты. Кроме высокодифференцированных гепатом, встречались также единичные анапластические и смешанного типа опухоли, в результате чего неповрежденной ткани печени сохранялось совсем мало.

По данным нашего предыдущего исследования [11], у крыс в первые месяцы введения ДЭНА активность ГК в печени временно возрастает, а в последующие (3—4-й месяцы) снижается до нормы или ниже ее. Аналогичные

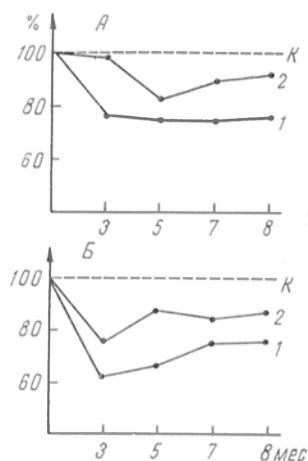


Рис. 1. Влияние гидрокортизона на активность ГК и ГЛК при гепатоканцерогенезе (в % от контроля).

А — активность ГК; Б — активность ГЛК. К — контроль, 1 — активность в печени интактных крыс; 2 — активность при гепатоканцерогенезе. В каждой группе средние данные 6—9 опытов.

результаты получены и в настоящей работе. После первичного повышения активность ГК в первые месяцы введения канцерогена активность фермента в конце 3-го месяца заметно снижалась, составляя 54 % от активности в нормальной печени. В конце 4-го месяца активность ГК находилась в пределах нормы, а в следующие месяцы явно нарастала. Так, в конце 7-го месяца активность ГК составляла 125 %, а в конце 8-го месяца — 150 % от контроля. Активность ГЛК при канцерогенезе оказалась пониженной, составляя в конце 3-го месяца 62 %, в конце 5-го месяца 67 % и в конце 7-го и 8-го месяца 70 % от активности в контроле.

При введении интактным крысам гидрокортизона активность ГК подавлялась на 25 % (рис. 1), а понижение активности ГЛК оказалось в разные периоды опыта различным. Так, в конце 3-го месяца активность фермента снижалась после введения гидрокортизона на 38 %, в конце 5-го месяца — на 33 %, а у более старых животных в конце 7-го и 8-го месяца — на 23 %. Различие в интенсивности действия гормона на активность ГЛК в разные периоды опыта, по-видимому, объясняется общеизвестным фак-

том уменьшения чувствительности многих ферментов на введение глюкокортикоидов с увеличением возраста. При blastomagenese по сравнению с интактными животными влияние гормона на активность ферментов оказалось иным. В конце 3-го месяца после инъекций гормона активность ГК вообще не изменялась. Возможно, что это было обусловлено относительно низким исходным уровнем активности фермента в указанный период (54 % от контроля), вследствие чего гидрокортизон не мог оказать влияния. Следует отметить, что в тот же период влияние гормона на активность ГЛК было также слабее, чем у контрольных крыс, и оказалось недостоверным ($P < 0,1 > 0,05$, см. рис. 1). Аналогичное явление мы отметили ранее в отношении фруктозо-1,6-дифосфатазы (Ф-1,6-ДФ-аза) [12] фермента, синтез которого индуцируется глюкокортикоидными гормонами [13]. При использовании той же модели канцерогенеза в конце 2-го месяца опыта влияние гидрокортизона на активность Ф-1,6-ДФ-азы не было обнаружено, в то время как у интактных крыс оно было вполне очевидным [12]. Эти результаты позволяют полагать, что уже на первых месяцах введения канцерогена нарушается регуляция активности ферментов глюкокортикоидами.

В конце 5-го месяца влияние гидрокортизона на активность ГК и ГЛК было меньшим, чем у контрольных крыс. После введения гормона активность ГК снижалась на 17 %, а активность ГЛК — на 12 % ($P > 0,05$) (в контроле соответственно 25 и 33 %). В следующие сроки опыта влияние

гидрокортизона еще больше ослабевало, составляя для ГК 8%, а для ГЛК 12%, и было несущественным ($P > 0,05$).

Нами было исследовано также влияние гидрокортизона на активность изоферментов ГК (рис. 2). Выяснилось, что подавление активности фермента гормоном происходит в основном за счет активности изофермента II ГК, что совпадает с данными литературы [6] и нашими предыдущими результатами [9]. Таким же, но менее выраженным, было влияние гормона на изоферменты ГК при гепатоканцерогенезе (см. рис. 2).

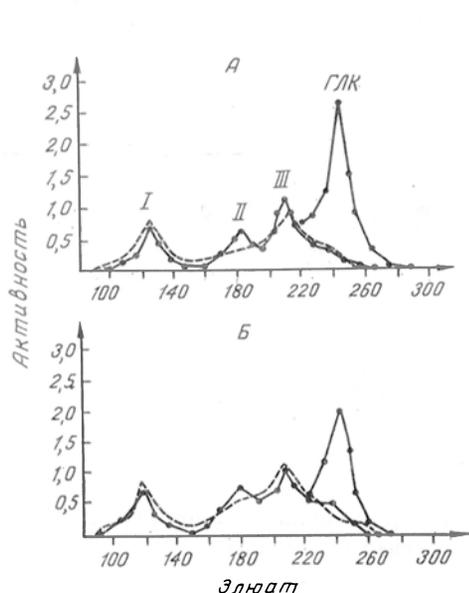


Рис. 2. Влияние гидрокортизона на изоферментный спектр ГК.

А — хроматограммы ГК у интактных крыс; Б — хроматограммы при гепатоканцерогенезе (в конце 6-го месяца). Активность изоферментов ГК (I, II и III) при концентрации глюкозы в среде 0,5 мМ и ГЛК при концентрации глюкозы 100 мМ. Активность выражена в микромолях НАДФ·Н в 1 мл элюата за 1 мин $\times 10^2$. Сплошная линия — изоферментный спектр ГК у контрольных крыс; пунктирная — после введения гидрокортизона. На каждой хроматограмме данные, полученные на печени 7—9 животных.

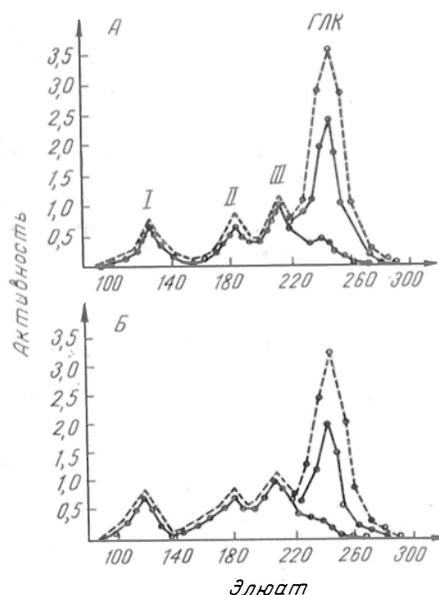


Рис. 3. Влияние инсулина на изоферментный спектр ГК.

Сплошная линия — изоферментный спектр ГК у контрольных крыс, пунктирная — после введения инсулина. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

При введении инсулина у интактных крыс отмечалось возрастание активности ГЛК (177% по сравнению с контролем, см. таблицу), а активность ГК существенно не изменялась. При гепатоканцерогенезе наблюдалось явное индуцирующее влияние инсулина на активность ГЛК. Так, в конце 5-го месяца активность фермента возрастала на 189% и в конце 8-го месяца — на 188% по отношению к исходной величине (у интактных крыс соответственно на 177%). Влияние инсулина на активность ГЛК в нормальной печени и при гепатоканцерогенезе подтверждалось также данными, полученными при хроматографическом разделении изоферментов ГК и ГЛК (рис. 3). На хроматограммах заметно значительное увеличение фракции ГЛК как у интактных крыс, так и при канцерогенезе.

Итак, результаты настоящей работы показывают, что при гепатоканцерогенезе влияние гидрокортизона на активность ключевых ферментов гликолиза — ГК и ГЛК — зависит от продолжительности введения ДЭНА и от стадии канцерогенеза, причем с прогрессированием опухолевого роста влияние гормона ослабевает. В то же время влияние инсулина на активность ГЛК в ткани печени по сравнению с интактными животными су-

ществительно не изменяется. Можно думать, что отсутствие или слабое влияние гидрокортизона на активность ферментов в первые (2—3-й) месяцы введения ДЭНА до появления опухолевых изменений объясняется первоначальным токсическим действием канцерогена на структурно-химические элементы клетки, в результате чего нарушаются регуляторные процессы и активируются защитные реакции организма. Такое предположение подтверждается и данными [14], показывающими, что при введении крысам

Влияние инсулина на активность ГК и ГЛК (микромоль НАДФ·Н на мг белка за 1 ч) при гепатоканцерогенезе

Условия опытов	Контроль	Инсулин	<i>P</i>	Изменение активности, %
ГК				
Интактные животные	0,07±0,01 (7)	0,08±0,01 (8)	>0,1	—
ДЭНА в течение 5 мес	0,11±0,01 (6)	0,10±0,01 (6)	>0,1	—
ДЭНА в течение 8 мес	0,12±0,02 (11)	0,14±0,02 (10)	>0,1	—
ГЛК				
Интактные животные	0,30±0,03 (7)	0,53±0,04 (8)	<0,05	176,7
ДЭНА в течение 5 мес	0,19±0,04 (7)	0,36±0,05 (7)	<0,05	189,4
ДЭНА в течение 8 мес	0,25±0,02 (11)	0,47±0,08 (10)	<0,05	188,0

Примечание. В скобках — число животных.

N-2-флюоренилацетамида в период перед появлением гиперпластических узелков в печени чувствительность триптофанпирролазы в отношении индуцирующего влияния гидрокортизона отсутствует. Этому не противоречат и данные Е. М. Самунджап [15], показывающие, что после первых инъекций диметилнитрозаминна крысам в надпочечниках резко повышается биосинтез кортикостероидов (явления стресса), а при дальнейшем введении этого канцерогена биосинтез кортикостероидов постепенно снижается. Если допустить, что аналогичная ситуация может наблюдаться и при введении ДЭНА, то не исключена возможность, что в первые месяцы канцерогенеза одной из причин неэффективности действия экзогенного гидрокортизона на активность ГК и ГЛК может являться высокое содержание кортикостероидов в организме.

Механизмы влияния глюкокортикостероидов на активность ферментов гликолиза, в том числе и на активность ГК и ГЛК, полностью не выяснены. Высказываются мнения, что под влиянием глюкокортикоидов усиленный глюконеогенез способствует понижению активности ферментов гликолиза [16—18].

Как уже отмечалось, с того периода, когда в ткани печени начали отмечать предопухолевые явления и появились первые признаки опухолей (5 мес), наблюдалось постепенное понижение чувствительности ГК (изофермента II) и ГЛК к действию гидрокортизона. Уместно добавить, что на поздних этапах канцерогенеза наблюдалось также ослабление чувствительности Ф-1,6-ДФ-азы к индуцирующему действию гидрокортизона [12]. Работами В. С. Шапота и соавт. [19—21] показано, что в печени мышшей с карциномой Эрлиха ослаблена чувствительность к действию гидрокортизона, индуцирующего синтез гликогена и новообразование глюкозы из неуглеводных соединений. Все эти факты указывают на то, что регулируемость обмена печени животного с опухолью глюкокортикоидами в значительной мере утрачивается. В пользу этого говорят и результаты настоящей работы, показывающие постепенное ослабление влияния гидрокортизона на активность ферментов, катализирующих первичное фосфо-

рирование гексоз, — ГК и ГЛК. Одновременное сохранение чувствительности ГЛК к инсулину создает благоприятные условия для снабжения клеток глюкозой и обеспечения гликолиза в процессе гепатоканцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sharma C., Manjeshwar R., Weinhouse S. — *J. biol. Chem.*, 1963, v. 238, p. 3844. — 2. Katzen H. M. — *Advanc. Enzym. Regulat.*, 1967, v. 5, p. 335. — 3. Ильин В. С. — *Вестн. АМН СССР*, 1969, № 8, с. 3. — 4. Walker D. C., Rao S. — *Biochem. J.*, 1964, v. 90, p. 360. — 5. Грекова Н. И. — *Вопр. мед. химии*, 1968, т. 14, с. 203. — 6. Шаныгина К. И. — *Биохимия*, 1971, т. 36, с. 363. — 7. Dakshinamurti K., Ho Chong Hong. — *Enzymol. biol. clin.*, 1970, v. 11, p. 423. — 8. Мертвцов Н. П. — *Биохимия*, 1969, т. 34, с. 381. — 9. Кильдема Л. А. — В кн.: Регуляция ферментных систем гормонами щитовидной железы и надпочечников. Таллин, 1974, с. 67. — 10. Salas M., Viñuela E., Sols A. — *J. biol. Chem.*, 1963, v. 238, p. 3535. — 11. Кильдема Л. А. — *Вопр. мед. химии*, 1975, т. 21, с. 195. — 12. Кильдема Л. А. — Там же, 1972, т. 18, с. 607. — 13. Weber G. — *Advanc. Enzym. Regulat.*, 1963, v. 1, p. 196. — 14. Teebor G. M., Seidman J. — *Cancer Res.*, 1970, v. 30, p. 1095. — 15. Самунджан Е. М. — В кн.: Кора надпочечников и опухолевый процесс. Киев, 1973, с. 46. — 16. Weber G., Vanperjee G., Bronstein S. — *J. biol. Chem.*, 1961, v. 236, p. 3106. — 17. Weber G., Singhal R. — *Ibid.*, 1964, v. 238, p. 521. — 18. Weber G., Ferdinands J. A., Quessner S. F. — *Advanc. Enzym. Regulat.*, 1971, v. 10, p. 39. — 19. Блинов В. А., Блинова Н. В., Любимова Н. В. и др. — *Пат. физиол.*, 1975, № 5, с. 59. — 20. Шапот В. С., Блинов В. А. — *Успехи биол. химии*, 1975, вып. 16, с. 196. — 21. Шапот В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста, М., 1975, с. 145.

Поступила 12/1 1978 г.

SENSITIVITY OF HEXOKINASE AND GLUCOKINASE TO HORMONAL EFFECT IN HEPATOCARCINOGENESIS

L. A. Kildema

Institute of Experimental and Clinical Medicine, Ministry of Public Health of the Estonian SSR, Tallin

Effects of hydrocortisone and insulin on activities of hexokinase and its isoenzymes and on glucokinase activity were studied in hepatocarcinogenesis, induced in rats by diethyl nitrosamine. After administration during 7 days of hydrocortisone into normal rats the hexokinase was inactivated by 25% due to decrease in activity of the II isoenzyme. In this case activity of glucokinase was decreased by 38% in young animals and — by 23% in older animals. Insulin, administered within 2 days, caused no effect on the hexokinase activity but the glucokinase was activated by 177%. In hepatocarcinogenesis the effect of hydrocortisone on the hexokinase activity (II isoenzyme) was distinctly decreased and with development of tumors the hormone showed a negligible efficiency. Influence of insulin on the glucokinase activity in hepatocarcinogenesis was similar to the effect found in normal liver tissue.

УДК 612.115.35:612.112.1

Л. А. Ляпина, С. М. Струкова, Б. А. Кудряшов

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА ГЕПАРИНА С ПРОТРОМБИНОМ

Лаборатория физиологии и биохимии свертывания крови Московского университета

Разработан метод получения комплексного соединения гепарина с протромбином при соотношении гепарина и протромбина, равном 1:6. Полученный комплекс гепарин — протромбин обладает антикоагулянтным, антиполимеризационным и неферментативным фибринолитическим действием на нестабилизированный фибрин как в отсутствие, так и в присутствии таких блокаторов ферментативного фибринолиза, как ϵ -аминокапроновая кислота или ингибитор трипсина из соевых бобов. При внутривенном введении этого комплекса крысам наблюдается повышение антикоагулянтных и неферментативных фибринолитических свойств крови. Продолжительность действия комплекса гепарин — протромбин сохраняется в организме до $T_{1/2}$ —2 ч.

Фибринолитическая активность на нестабилизированном фибрине комплекса гепарин — протромбин

Условия опыта	Зоны лизиса на нестабилизированном, фибрине, мм ² комплекса гепарин — протромбин в соотношении					протромбина	гепарина
	6:1	1:1	1:6	1:12	1:24		
	<p>В присутствии 0,85% NaCl P</p> <p>В присутствии ε-аминокапроновой кислоты в конечной концентрации 3% P</p> <p>В присутствии ингибитора трипсина из соевых бобов в конечной концентрации 0,2% P</p>	0 ± 0 (5) $> 0,5$	25 ± 0 (5) $< 0,01$	$90 \pm 1,6$ (10) $< 0,001$	$85 \pm 2,5$ (8) $< 0,001$		
	—	—	$92 \pm 3,7$ (7) $< 0,001$	—	—	0 ± 0 (7)	0 ± 0 (7)
	—	—	$90 \pm 2,0$ (7) $< 0,001$	—	—	0 ± 0 (4)	0 ± 0 (4)

Примечание. Здесь и в табл. 2—4 в скобках — число опытов. Статистические показатели рассчитаны относительно контрольных проб с гепарином.

В предыдущих исследованиях показано, что гепарин образует комплексные соединения с рядом тромбогенных белков крови — фибриногеном [1, 2], тромбопластином, антиплазмином [3], фактором XIII [4], тромбином [5—8]. Комплексы гепарина с перечисленными белками крови обладают неферментативным фибринолитическим действием на нестабилизированный фибрин, антикоагулянтной и антиполимеризационной активностью и являются гуморальными агентами противосвертывающей системы [9—10].

Обнаружено подавление свертывающей активности тромбина в комплексе с гепарином при сохранении его эстеразной активности [11, 12]. Поскольку известно, что тромбин способен вступать в соединение с гепарином, интересно было выяснить способность к комплексобразованию с гепарином профермента тромбина — протромбина, не обладающего в отличие от тромбина ни свертывающей, ни эстеразной активностью [13].

В настоящей работе была исследована возможность комплексобразования гепарина с протромбином и предпринята попытка получения *in vitro* комплекса гепарина с протромбином и изучения его физико-химических и некоторых биологических свойств.

Методика

В работе использован протромбин, выделенный из бычьей крови [14, 15]. Препараты протромбина были гомогенны при электрофорезе в полиакриламидном геле и не содержали примеси фактора X, обладали активностью 400—900 NIH ед/мг, которую определяли описанным методом [16].

Комплексообразование между гепарином и протромбином контролировали спектрофотометрически в ультрафиолетовой области спектра на спектрофотометре «Ulicam SP-8000».

Фибринолитическую активность полученного комплекса определяли на нестабилизированных пластинах фибрина [17], антикоагулянтные свойства — по изменению тромбинового

времени в реакции: 0,1 мл комплекса гепарин — протромбин или его составных частей в эквивалентном количестве +0,1 мл 0,3% фибриногена +0,1 мл тромбина стандартной активности. Антиполимеризационную активность определяли в реакции: 0,2 мл чистого фибрин-мономера +0,7 мл буфера Палитча pH 7,6; для образования сгустка пробы выдерживали 15 мин при 37°C, после чего к сгустку добавляли 0,1 мл 0,1% комплекса гепарин — протромбин (опыт) или составные части комплекса в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексе.

С целью изучения биологических свойств комплекса гепарин — протромбин проведены эксперименты на 29 крысах-самцах массой 180—200 г. Подопытным животным в в. jugularis вводили по 0,5 мл 0,1% раствора комплекса гепарин — протромбин на 200 г веса тела, контрольным — по 0,5 мл растворов гепарина или протромбина в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексе, и 0,5 мл 0,85% раствора NaCl. Кровь брали из в. jugularis стеклянным шприцем с 3,8% раствором цитрата натрия при соотношении цитрата и крови, равном 1 : 9, через 10, 90 и 120 мин после введения соответствующих препаратов.

Определяли суммарную фибринолитическую активность плазмы, ее неферментативный фибринолиз на нестабилизированных пластинах фибрина [17, 18], концентрацию фибриногена [19], показатели R и K тромбозластограммы на тромбозластографе «Тромб-2».

Результаты и о б с у ж д е н и е

Как видно из данных табл. 1, комплекс гепарин — протромбин, полученный при соотношении гепарина и протромбина, равном 1 : 6, и осаждаемый при pH 4,5—4,6, обладает достаточной неферментативной фибринолитической активностью (зоны лизиса составляют 85 мм²), которая сохраняется в присутствии таких блокаторов ферментативного фибринолиза, как ε-аминокапроновая кислота в конечной концентрации 3%, ингибитор трипсиона из соевых бобов (конечная концентрация 0,2%), и исчезает в присутствии протамина сульфата (конечная концентрация 0,3%). Комплекс гепарин — протромбин, полученный при соотношениях гепарина и протромбина, равных 1 : 1 и 1 : 12, также обладают неферментативным фибринолитическим действием, однако при соотношении гепарина и протромбина в комплексе, равном 1 : 1, эта активность снижается более чем в 3 раза (см. табл. 1).

Комплекс гепарин — протромбин обладает и достаточно высокой антикоагулянтной активностью (табл. 2). В его присутствии не образуется сгустка в среде с фибриногеном и тромбином в течение 3 мин и более. Контрольный раствор гепарина в дозе, эквивалентной его содержанию в комплексе, в тех же условиях задерживает образование сгустка до 110±10 с.

Т а б л и ц а 2

Антикоагулянтные свойства комплекса гепарин — протромбин (соотношение гепарина и протромбина равно 1 : 6)

Условия опыта	Время образования сгустка с 0,3% фибриногеном и тромбином
Комплекс гепарин — протромбин	Более 3 мин (7) $P < 0,001$
Гепарин	100±10 (6) $P < 0,001$
Протромбин	40±1,6 (6) $P > 0,5$
Физиологический раствор	40±1,6 (6)

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно контроля с физиологическим раствором NaCl.

Т а б л и ц а 3

Антиполимеризационная активность комплекса гепарин — протромбин (соотношение гепарина и протромбина равно 1 : 6)

Условия опыта	Количество оставшегося в сгустке белка, мг на 100 мл
Комплекс гепарин — протромбин	250±7,6 (7) $P < 0,001$
Гепарин	260±12,4 (5) $P < 0,001$
Протромбин	300±15 (5) $P > 0,5$
Физиологический раствор	305±10 (7)

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно контрольных проб с физиологическим раствором.

В присутствии же соответствующей дозы протромбина антикоагулянтная активность не меняется и составляет, как и в контроле с 0,85 % физиологическим раствором, 40 с.

При исследовании антиполимеризационных свойств комплекса гепарин — протромбин обнаружено, что он, как и другие комплексные соединения гепарина [9], способен задерживать полимеризацию фибрина (табл. 3). Так, если в присутствии 0,85 % NaCl (контроль) концентрация белка в сгустке составляла 305 ± 10 мг на 100 мл, то в присутствии гепарина она снизилась до $260 \pm 12,4$ мг на 100 мл, а в присутствии комплекса гепарин — протромбин — до $250 \pm 7,6$ мг на 100 мл.

Комплексообразование между гепарином и протромбином было доказано спектральным методом (рис. 1). Наличие дифференциального спектра протромбина относительно комплекса гепарин — протромбин, отличного от нуля, свидетельствует об истинном комплексообразовании между гепарином и протромбином.

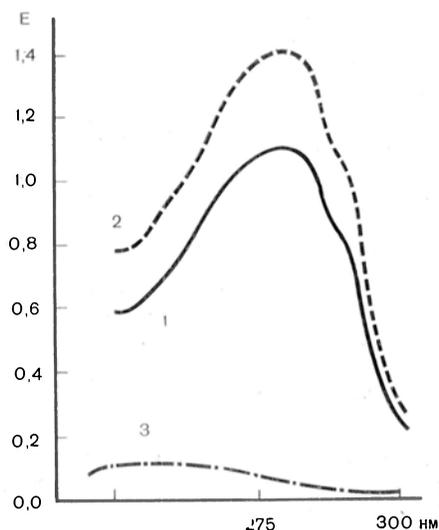


Рис. 1. Спектр поглощения в УФ-области комплекса гепарин — протромбин в соотношении 1 : 6 (1), протромбина (2) и гепарина (3).

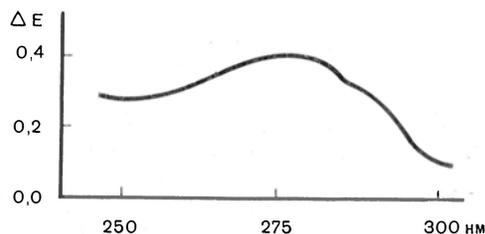


Рис. 2. Дифференциальный спектр поглощения протромбина относительно комплекса гепарин — протромбин.

На рис. 2 представлены спектры поглощения в УФ-области комплекса гепарин — протромбин, гепарина и протромбина в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексе. Комплекс и протромбин имеют свой характерный спектр поглощения, причем максимум спектра поглощения протромбина и комплекса наблюдается при 280 нм, при 292 нм в обоих случаях наблюдается изгиб.

При исследовании биологического действия комплекса гепарин — протромбин на животных установлено, что уже через 10 мин после внутривенного введения крысам комплекса плазмы крови увеличивается суммарная фибринолитическая активность в 2,8 раза, а неферментативный фибринолиз плазмы — в 6,3 раза по сравнению с теми же показателями у контрольных животных, получавших физиологический раствор. При этом концентрация фибриногена снижается с 325 до 278 мг на 100 мл, увеличиваются показатели R и K тромбоэластограммы (табл. 4). В пробах, полученных от крыс через 10 мин после инъекции эквивалентной дозы гепарина, суммарная фибринолитическая активность плазмы увеличивается в 1,4 раза, а неферментативный фибринолиз плазмы — в 2,5 раза, достоверно увеличивается показатель R тромбоэластограммы и незначительно снижается концентрация фибриногена. Следует отметить, что инъекция эквивалентного количества одного протромбина не вызывала заметных изменений изучаемых показателей крови (см. табл. 4).

Возникает вопрос, как долго комплекс гепарин — протромбин сохраняет свои антикоагулянтные и фибринолитические свойства в кровотоке

Таблица 4

Суммарная фибринолитическая активность (СФА) плазмы крови, ее неферментативный фибринолиз (НФ), концентрация фибриногена (Ф), показатели R и K тромбозластограммы через 10, 90 и 120 мин после введения комплекса гепарин — протромбин в дозе 1 мг на 200 г массы животного и его составных частей в эквивалентном количестве

	Введение комплекса гепарин — протромбин					Введение			
	СФА	НФ	Ф, мг %	R	K	СФА	НФ	Ф, мг %	R
	мм ²			с		мм ²			с
До введения	43,8±4,0 (8)	15±1,2 (8)	338±10 (8)	68±4 (5)	94±8 (5)	40±2,5 (5)	12,3±2 (5)	361±7,8 (5)	70±4 (3)
Через 10 мин после введения	117±2,8 (8)	63,3±4,3 (8)	278±7,7 (8)	168±3,4 (5)	196±3,8 (5)	46±2,0 (5)	15,3±2,2 (5)	357±11,5 (5)	60±2,0 (3)
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5
Через 90 мин после введения	72±1,1 (8)	24,3±0,9 (8)	315±17,3 (8)	102±4,4 (5)	118±4,8 (5)	41±2,5 (5)	14,3±2,0 (5)	335±4 (4)	70±4 (3)
Через 120 мин после введения	<0,001 44±4 (7)	<0,01 12±1 (7)	>0,5 330±10 (7)	<0,01 74±3,4 (4)	<0,05 100±3 (4)	>0,5 —	>0,5 —	>0,5 —	>0,5 —
<i>P</i>	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	—	—	—	—

протромбина	Введение гепарина					Введение физиологического раствора				
	СФА	НФ	Ф, мг %	R	K	СФА	НФ	Ф, мг %	R	K
	мм ²			с		мм ²			с	
95±7 (3)	44,6±1,2 (8)	12,3±1,7 (8)	335±10,4 (8)	70±4 (5)	100±9,9 (5)	39±1,1 (8)	9±0,9 (3)	355±7,9 (8)	60±2 (4)	90±2 (4)
98±7 (3)	59±2,2 (8)	25±3,4 (8)	300±12 (8)	100±10 (4)	120±5,6 (4)	41±2 (8)	10±0,9 (8)	325±4,5 (8)	60±2 (4)	90±2 (4)
>0,5	<0,01	<0,001	>0,5	<0,01	<0,01	—	—	—	—	—
95±7 (3)	42±2,6 (8)	14±2 (8)	335±4 (8)	70±4 (4)	90±6,9 (4)	42±2 (8)	10±0,9 (8)	342±4,5 (8)	64±2,3 (3)	92±7 (3)
>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	40,8±0,8 (5)	12±2 (5)	354±8,7 (4)	64 (2)	88 (2)
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

после его внутривенного введения животным. Для решения этого вопроса кровь исследовали через 90 и 120 мин после инъекции комплекса гепарин— протромбин. Обнаружено, что суммарная фибринолитическая активность и неферментативный фибринолиз плазмы крови, показатели R и K тромбозаэстограммы через 90 мин после введения все еще превышали контрольный уровень, наблюдаемый у животных, получавших 0,85 % NaCl, протромбин или гепарин в эквивалентных дозах ($P < 0,001$) (см. табл. 4). Через 120 мин после внутривенного введения комплекса крысам все изучаемые показатели свертывающей и противосвертывающей систем крови возвращаются к контрольному уровню (см. табл. 4).

На основании проведенных исследований можно заключить, что полученное нами комплексное соединение гепарина с протромбином благодаря своим свойствам растворять нестабилизированный фибрин в присутствии блокаторов ферментативного фибринолиза может быть отнесено к ряду физиологических растворителей нестабилизированного фибрина. In vivo в присутствии этого комплекса увеличивается антикоагулянтный и неферментативный фибринолитический потенциал крови, который сохраняется в течение $1\frac{1}{2}$ ч эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Godal H. C.—Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1961, N 13, p. 153—156.
2. Кудряшов Б. А., Калишевская Т. М., Ляпина Л. А.—Вопр. мед. химии, 1968, № 3, с. 277.
3. Кудряшов Б. А., Пасторова В. Е., Глотова В. Л.—Вопр. мед. химии, 1967, № 1, с. 29.
4. Kudryashov B. A., Ulianov A. M., Liarina L. A.—Thrombos. Res., 1973, v. 3, p. 589.
5. Amap R., Werle E.—Klin. Wschr., 1957, Bd 35, S. 22.
6. Markwardt F., Walzmann P.—Hörre—Seyler's Z. physiol. Chem., 1959, Bd 317, S. 64.
7. Кудряшов Б. А., Калишевская Т. М., Полякова Л. А.—Вопр. мед. химии, 1966, № 2, с. 114.
8. Кудряшов Б. А.—Пробл. гематол., 1972, № 4, с. 3.
9. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М., 1975.
10. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А.—Вестн. Московск. ун-та. Сер. 6. Биол., 1973, № 4, с. 3.
11. Gans H., Voulton L.—Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.), 1969, Bd 22, S. 28.
12. Maschovich—Biochim. biophys. Acta, 1975, v. 412, p. 13.
13. Струкова С. М.—Вестн. Московск. ун-та. Сер. 6. Биол., 1975, № 6, с. 22—40; 1976, № 1, с. 17.
14. Stepp R. S., Blood E. R.—Biochemistry (Wash.), 1972, v. 11, p. 4502.
15. Струкова С. М.—Биохимия, 1976, т. 41, № 4, с. 643.
16. Magnusson S.—Arkiv. kemi, 1965, v. 23, p. 285.
17. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Баскова И. П.—Вестн. Московск. ун-та. Сер. 6. Биол., 1974, № 5, с. 39.
18. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А.—Лаб. дело, 1971, № 6, с. 326.
19. Bidwell E.—Biochem. J., 1953, v. 155, p. 497.

Поступила 3/II 1978 г.

FORMATION OF COMPLEX HEPARIN-PROTHROMBIN

L. A. Lyapina, S. M. Strukova, B. A. Kudryashov

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Formation of complex between heparin and prothrombin was shown using a spectral method. A method is developed for production of active complex heparin-prothrombin with the ratio of components as 1 : 6. The heparin-prothrombin complex obtained exhibited the anticoagulant and antipolymerization properties as well as the nonenzymatic fibrinolytic effect on instabilized fibrin both in absence and in presence of such blocking agents of enzymatic fibrinolysis as ϵ -aminocaproic acid and soybean inhibitor of trypsin. The increase in the anticoagulant and nonenzymatic fibrinolytic properties of blood occurred after intravenous administration of the complex into animals. The heparin-prothrombin complex acted in circulation within 1.5-2 hrs.

И. В. Чибисов, Е. Л. Розенфельд, Л. В. Чистова, А. Ф. Леонтьев

ГЛИКОГЕНОВАЯ БОЛЕЗНЬ, ВЫЗВАННАЯ ДЕФЕКТАМИ ФОСФОРИЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР и Институт педиатрии
АМН СССР, Москва

Представлены данные исследования концентрации гликогена и активности ферментов, участвующих в его обмене, в пунктате печени 3 больных с клиническими проявлениями печеночной формы гликогеноза. Обнаружено, что накопление гликогена в ткани печени у всех больных вызвано значительным снижением активности фосфорилазы. У 2 больных низкая активность фосфорилазы А печени вызвана нарушением активностью одного из ферментов, активирующих фосфорилазу, а у 1 больного — низкой активностью самой фосфорилазы Б. Данные по исследованию обмена гликогена in vitro сопоставляли с данными, полученными при исследовании его обмена in vivo с помощью нагрузочных проб с адреналином. Эти исследования дают возможность разрабатывать методы лечения больных с нарушениями активности фосфорилазы печени.

Среди различных типов гликогенозов имеются заболевания, вызванные снижением активности фосфорилазы печени и значительным накоплением в печени гликогена. Это снижение может быть вызвано либо низкой активностью самой фосфорилазы, либо нарушениями в активности ферментов, активирующих фосфорилазу. Как известно, в активации фосфорилазы участвуют киназа фосфорилазы Б, протеинкиназа и аденилатциклаза. Дефект в активности любого из этих ферментов дает в конечном итоге один и тот же эффект — снижение активности фосфорилазы А [1]. Клинические проявления заболевания во всех этих случаях практически одинаковы: незначительная гепатомегалия и слабо выраженная гипогликемия; концентрация лактата в крови, взятой натощак, находится при этом практически в пределах нормы. Поэтому заболевания, вызванные дефектом фосфорилазной системы, протекают обычно легче, чем другие типы гликогенозов печени. В настоящем сообщении приводятся данные о содержании гликогена и активности ферментов печени, участвующих в его обмене, у трех больных с клиническими проявлениями гликогеноза: гепатомегалией и гипогликемией, обнаруженными в течение первого года жизни. У всех этих больных нагрузка галактозой приводила к повышению лактата крови, что является одним из характерных признаков гликогеноза печени.

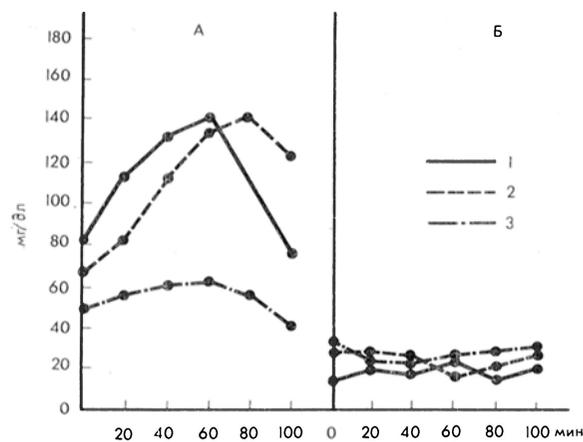
М е т о д и к а

Содержание глюкозы в крови определяли с помощью глюкозооксидазного метода [2], молочной кислоты — с помощью п-оксидифенилового реактива [3]. Адреналиновый тест был проведен посредством внутримышечной инъекции 0,1% раствора адреналина из расчета 0,1 мл на 1 год жизни. Ткань печени, полученную путем игольчатой биопсии в количестве от 12 до 20 мг, немедленно замораживали до -78°C и хранили не более 36 ч. Концентрацию гликогена определяли с помощью микрометода Хьюинга [4], активность глюкозо-6-фосфатазы — методом Херса в модификации Хьюинга [4], активность фосфорилазы — с помощью метода Стальмана и Херса, позволяющего косвенно судить об активности как фосфорилазы А, так и фосфорилазы Б [5]. Активность фосфорилазы Б определяли в присутствии Na_2SO_4 и АМФ, активность фосфогексонизомеразы — методом Слейна [6], при этом фосфаты, образовавшиеся после гидролиза глюкозо-1-фосфата, определяли с помощью FeSO_4 [4]. Активность фруктозо-1,6-дифосфатазы устанавливали по образованию неорганического фосфата при действии гомогената печени на фруктозо-1,6-дифосфат. Неорганический фосфат определяли с помощью SnCl_2 . Активность амило-1,6-глюкозидазы и кислой α -глюкозидазы измеряли методом Херса [7].

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

В таблице приведены данные о содержании гликогена и активности ферментов обмена гликогена в ткани печени. У всех 3 больных содержание гликогена в печени оказалось значительно повышенным. У 2 больных (М. Ш. и М. С.) активность всех ферментов, кроме фосфорилазы, была в норме.

При исследовании активности фосфорилазы у этих больных оказалось, что активность фермента без добавления Na_2SO_4 и АМФ была снижена, в то время как при их добавлении активность фосфорилазы была в пределах нормы. Как известно, в норме в ткани печени А и Б формы этого фермента находятся, как правило, примерно в равном соотношении [5].



Глицемические (А) и лактатемические (Б) кривые в ответ на введение адреналина.

1 — норма; 2 — больной М. Ш.; 3 — больной Э. М.

Исследование активности фосфорилазы печени больных М. Ш. и М. С. показало, что у этих больных в печени практически вся фосфорилаза находится в форме Б, по-видимому, из-за нарушения активности киназы фосфорилазы Б или протеинкиназы (IX и X тип гликогеноза).

У третьего больного (Э. М.), кроме снижения активности фосфорилазы, наблюдалось снижение активности глюкозо-6-фосфатазы. Однако нормальная концентрация лактата в крови, взятой натощак, отсутствие снижения его

концентрации после нагрузки глюкозой и отсутствие повышения концентрации лактата в крови при нагрузке адреналином исключали гликогеноз I типа. В то же время у этого больного обнаружить активность фосфорилазы печени как в присутствии, так и в отсутствие Na_2SO_4 и АМФ. Содержание гликогена и активность ферментов, участвующих в его, обмене, в биоптатах печени больных

Изученный показатель	Больные			Норма
	М. Ш.	М. С.	Э. М.	
Пол	М.	М.	М.	М.
Возраст, годы	4,5	2	3	—
Гликоген, % от массы ткани	12,2	11,4	12	<6
Активность ферментов:				
фосфорилаза *				
без АМФ и Na_2SO_4	8,8	6,6	1,3	15—55
с АМФ и Na_2SO_4	28,5	22,0	2,6	15—55
глюкозо-6-фосфатаза *	6,4	8,3	2,0	4—15
фосфоглюкомутаза *	40	135	95	25—100
фосфогексоизомераза **	15	—	34	25—100
фруктозо-1,6-дифосфатаза *	16	2,8	2,1	1,2—1,6
амило-1,6-глюкозидаза ***	0,44	0,6	1,36	0,4—1,1
кислая α -глюкозидаза ***	—	0,96	1,4	0,6—2,4

* В микромолях фосфата на 1 г ткани за 1 мин.

** В микромолях фруктозо-6-фосфата на 1 г ткани за 1 мин.

*** В микромолях глюкозы на 1 г ткани за 1 мин.

не удавалось, т. е. у данного больного дефект был вызван нарушением активности самой фосфорилазы, следовательно, в этом случае речь идет о гликогенозе VI типа.

Интерес представляет рассмотрение лактатемических и глицемических кривых больных при нагрузке адреналином. Как видно на рисунке, у боль-

ного Э. М. с гликогенозом VI типа, т. е. с недостаточностью фосфорилазы, введение адреналина практически не приводит к повышению содержания глюкозы в крови; концентрация лактата в крови также не меняется. У больного М. Ш. с дефектом активности одного из ферментов, активирующих фосфорилазу (IX или X тип гликогеноза), введение адреналина вызывает значительное увеличение содержания глюкозы в крови, что свидетельствует о наличии фосфорилазы печени и ее активации *in vivo* адреналином.

Гликемические кривые в ответ на введение адреналина при гликогенозах, вызванных нарушениями фосфорилазной системы, различны в зависимости от того, что является причиной снижения активности фосфорилазы. Например, известно, что при IX типе наблюдается повышение содержания глюкозы в крови, в то время как при VI и X типах гликогеноза его не обнаруживают [8, 9]. Это повышение содержания глюкозы в крови в ответ на введение адреналина при гликогенозе IX типа, возможно, связано с тем, что, несмотря на отсутствие активности киназы фосфорилазы Б, активация фосфорилазы Б может осуществляться не только с помощью циклической АМФ, но и какими-то побочными путями [10].

Выяснение вопроса о том, какое звено фосфорилазной системы нарушено, важно при применении гормонов для снижения концентрации гликогена печени. В том случае, если дефект касается самого фермента (как в случае, описанном для больного Э. М.), применение гормона нецелесообразно. Однако в том случае, когда введение гормона приводит, при недостаточной активности фосфорилазы печени, к гипергликемии (как в случае, описанном для больного М. Ш.), применение гормона могло бы дать, вероятно, положительный эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hug G. — *Lancet.*, 1971, v. 2, p. 814. — 2. Лукомская И. С., Гордеецкий В. К. — *Вопр. мед. химии*, 1960, № 6, с. 641—642. — 3. Barker S. B., Summers W. H. — *J. biol. Chem.*, 1941, v. 138, p. 538—554. — 4. Huijzing F. — In: *Clinical Biochemistry* Ed. H. Ch. Curtius, M. Rot. Valter de Gruyter. New York, 1974, p. 1203—1235. — 5. Stalman W., Hers H. G. — *Europ. J. Biochem.*, 1975, v. 54, p. 341—350. — 6. Stein M. W. — *Meth. Enzymol.*, 1955, v. 1, p. 299—305. — 7. Hers H. G. — *Advanc. Metab. Dis.*, 1964, v. 1, p. 1—44. — 8. Fernandes J., Huijzing F., Van de Kamur J. — *Arch. Dis. Childh.*, 1969, v. 44, p. 311—316. — 9. Fernandes J., Koster J. F., Grose W. F. A. et al. — *Ibid.*, 1974, v. 49, p. 186—191. — 10. Bristrom C. O., Hunkeler F. L., Krebs E. G. — *J. biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 1961—1967.

Поступила 5/1 1978 г.

GLYCOGENIC DISEASE, CAUSED BY IMPAIRMENTS IN PHOSPHORYLASE SYSTEM OF LIVER TISSUE

I. V. Chibisov, E. L. Rosenfeld, L. V. Chistova, A. F. Leont'ev

Institute of Biological and Medical Chemistry, Institute of Pediatrics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Concentration of glycogen and activity of enzymes, participating in its metabolism, were studied in punctates of liver tissue obtained from three patients with clinical manifestations of hepatic forms of glycogenosis. Accumulation of glycogen in liver tissue of the patients was caused by distinct decrease in the phosphorylase activity. In two patients low activity of phosphorylase A was due to impairment of one of the enzymes, activating the phosphorylase in liver tissue, and in one patient phosphorylase B itself exhibited low activity. The *in vitro* data on glycogen metabolism were correlated with those, obtained in study of glycogen turnover *in vivo*, after loading with adrenaline. The data obtained enable to develop methods for treatment of the patients with impairments in activity of liver phosphorylase.

Л. В. Розе, И. А. Попова

ВЛИЯНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА И СЕРОТОНИНА НА ОБМЕН ГЛИКОГЕНА В ТКАНЯХ КРЫСЫ

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

Исследовали in vivo влияние биогенных аминов — норадреналина и серотонина — на фосфорилазу, кислую α -глюкозидазу (γ -амилазу), гликогенсинтазу, а также на содержание гликогена в сердечной мышце, печени и скелетных мышцах крысы. Введение норадреналина и серотонина обуславливало активацию фосфорилазы в сердечной мышце, печени и скелетных мышцах. В сердечной мышце и печени введение норадреналина вызывало снижение активности кислой α -глюкозидазы, а в скелетных мышцах не оказывало влияния на активность этого фермента. Введение серотонина не оказывало влияния на активность кислой α -глюкозидазы во всех исследованных тканях. При введении обоих аминов наблюдали торможение активности гликогенсинтазы I в сердечной мышце, в то время как в скелетных мышцах и печени статистически достоверных изменений в активности этого фермента не было. При введении норадреналина содержание гликогена в сердечной мышце снижалось, а при введении серотонина — повышалось. В печени при введении обоих аминов концентрация гликогена значительно снижалась, а в скелетных мышцах практически не менялась. Обсуждается возможная взаимосвязь фосфорилиза и гидролиза гликогена в условиях гипоксии миокарда, вызванной введением норадреналина.

Накопление и мобилизация гликогена в клетке in vivo зависит от соотношения скоростей его синтеза и распада. Активности ферментов, участвующих в обмене гликогена, как известно, изменяются в зависимости от целого ряда факторов, в том числе и от действия гормонов [1]. При изучении регуляции обмена гликогена до настоящего времени почти не исследовалась роль кислой α -глюкозидазы (γ -амилазы), осуществляющей гидролитический распад гликогена в лизосомах, а также возможная взаимосвязь различных путей обмена гликогена.

Ранее было показано, что введение животным некоторых биогенных аминов (адrenalина, норадреналина и др.) оказывало неодинаковое действие на γ -амилолиз гликогена в различных органах [2]. Действие серотонина на данный процесс совершенно не изучено. В связи с фармакологической значимостью не только норадреналина, но и серотонина представляло интерес сравнить действие обоих аминов на синтез и распад гликогена (фосфоролитический и гидролитический) в тканях крысы — сердечной мышце, печени и скелетных мышцах — и на содержание гликогена в этих тканях, чтобы подойти к выяснению возможных механизмов регуляции превращений гликогена под действием этих аминов.

Самцы крыс линии Вистар массой 150—200 г перед опытом не получали пищу в течение 17—18 ч, имея свободный доступ к воде. Раствор гидротартрата норадреналина (Украинский институт эндокринологии, Харьков) и креатининсульфата серотонина (Gee Lawson, Англия) на 0,85% NaCl вводили подкожно в абдоминальную область из расчета 0,46 и 2,3 мкмоль на 200 г массы тела соответственно. Контрольным животным вводили физиологический раствор в том же объеме. Через 30 мин животных декапитировали. Ткани быстро извлекали и замораживали между блоками сухого льда. В качестве скелетных мышц использовали икроножные. Активность общей фосфорилазы и фосфорилазы А определяли согласно методу [3] и выражали в микромолях Р_i/мин на 1 г ткани. Активность кислой α -глюкозидазы определяли в частично очищенном препарате фермента. Ткани гомогенизировали на холоду в стеклянном гомогенизаторе с двумя объемами 25 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА pH 6,9 и оставляли при комнатной температуре на 30 мин для экстракции, затем центрифугировали 20 мин при 7000 об/мин при комнатной температуре. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость доводили 0,5 М СН₃СООН до pH 4,8, прогревали при 60°С в течение 20 мин и снова центрифугировали (10 мин при 8000 об/мин). Полученный супернатант использовали в качестве ферментного препарата, лишенного примеси α -амилазы. Активность фермента определяли, применяя в качестве субстрата гликоген. Пробы, содержащие 0,1 мл частично очищенного препарата кислой α -глюкозидазы и 0,1 мл раствора гликогена (30 мг/мл) на 0,1 М ацетатном буфере с 0,001 М ЭДТА pH 4,8, инкубировали при 37°С. Реакцию останавливали, добавляя 0,4 мл 0,3 н. NaOH и 0,4 мл 5% ZnSO₄. В надосадочной жидкости определяли содержание глюкозы глюкозооксидазным методом [4]. Актив-

ность выражали в микромолях глюкозы в минуту на 1 мг белка. Белок измеряли методом Лоури [5]. Активность гликогенсинтетазы определяли по включению радиоактивной глюкозы, меченной по ^{14}C , из ^{14}C -УДФ-глюкозы в гликоген, используя 10% гомогенат сердечной мышцы и 20% гомогенат скелетных мышц, приготовленные по методу [6], и 10% гомогенат печени, приготовленный по методу [7]. Гомогенаты не центрифугировали, чтобы избежать возможных потерь фермента при осаждении [7]. Реакционная смесь содержала 0,1 мл гомогената и 0,2 мл субстратной смеси, состоящей из 50 мМ трис-НСI-буфера рН 7,8; 5 мМ ЭДТА; 1% гликогена; 13,4 мМ глюкозо-6-фосфата и ^{14}C -УДФ-глюкозы (уд. радиоактивность 284 мКи/ммоль, 30 000 имп/мин в пробе, Amersham), — для сердечной мышцы и скелетных мышц и 50 мМ трис-НСI буфера рН 7,5; 5 мМ ЭДТА; 1% гликогена; 6 мМ глюкозо-6-фосфата; ^{14}C -УДФ-глюкозы (30 000 имп/мин в пробе) — для печени.

Т а б л и ц а 1

Активность фосфорилазы (в микромолях P_1 в минуту на 1 г ткани) в сердечной мышце, печени и скелетных мышцах крысы при введении норадреналина и серотонина ($M \pm m$)

Исследованная ткань	Контроль		Норадреналин		Серотонин	
	А+Б	А	А+Б	А	А+Б	А
Сердечная мышца	53,6±4,0 (12)	19,8±5,7 (12)	58,4±2,6 (12)	24,3±6,9* (12)	72,8±5,4* (8)	36,5±9,4* (8)
<i>P</i>				0,05	0,01	0,01
Печень	53,5±5,5 (12)	46,4±4,7 (12)	60,2±7,3 (12)	54,7±5,7* (12)	62,4±5,1* (12)	56,1±3,7* (12)
<i>P</i>				0,05	0,05	0,01
Скелетные мышцы	248,5±30,6 (10)	107,0±16,8 (10)	273,6±18,3 (10)	165,9±28,3* (10)	274,6±21,2 (10)	178,9±12,6* (10)
<i>P</i>				0,01		0,01

П р и м е ч а н и е. А — активность фосфорилазы А; А+Б — активность общей фосфорилазы. Здесь и в табл. 2—4 в скобках число животных; статистически отличимые от контроля значения отмечены звездочкой.

Активность гликогенсинтетазы I определяли без глюкозо-6-фосфата, активность гликогенсинтетазы I-D — в присутствии глюкозо-6-фосфата. Реакционную смесь инкубировали при 37°C, реакцию останавливали добавлением 1 мл 30% КОН и последующим кипячением в течение 10 мин на водяной бане. После 3-кратного переосаждения гликогена в 66% этаноле 0,7 мл водного раствора гликогена вносили в 10 мл сцинтилляционной жидкости [8] и просчитывали на счетчике Mark II, Nuclear Chicago, США. В этих условиях концентрация субстрата была насыщающей и нарастание продукта реакции было прямо пропорционально во времени в течение 15 мин. Активность выражали в микромолях глюкозы в минуту на 1 г ткани.

Гликоген из тканей выделяли, переосаждая полисахарид в 66% этаноле 3 раза после солиubilизации ткани в 30% горячем растворе КОН [9]. Концентрацию гликогена определяли после его ферментативного гидролиза амилоглюкозидазой из *Asp. niger* [10], измеряя количество образующейся при этом глюкозы глюкозооксидазным методом [4], и выражали в миллиграммах гликогена на 1 г ткани.

Результаты и обсуждение

Гликогенфосфорилаза. Удельная активность фосфорилазы А у голодных животных наиболее высокая в скелетных мышцах, наиболее низкая — в сердце. В мышечной ткани скелетных и сердечной мышц больше половины общей активности приходится на долю фосфорилазы Б. В печени почти вся фосфорилазная активность представлена фосфорилазой А (табл. 1). При введении норадреналина и серотонина активность фосфорилазы А повышалась во всех исследованных тканях, в то время как активность общей фосфорилазы статистически достоверно повышалась только после введения серотонина в сердце и печени.

Кислая α -глюкозидаза. Сравнение величин удельной активности кислой α -глюкозидазы в различных тканях показало, что наиболее активен этот фермент в печени, менее в сердце и еще менее в скелетных мышцах (табл. 2). В сердечной мышце под влиянием норадреналина наблюдали снижение глю-

коамилазной активности кислой α -глюкозидазы в среднем на 35% (см. табл. 2). В печени введение норадреналина также вызывало снижение активности кислой α -глюкозидазы. Введение серотонина не приводило к изменениям активности этого фермента в сердечной мышце и печени. В скелетных мышцах исследуемые амины не вызывали изменений в активности кислой α -глюкозидазы (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Активность кислой α -глюкозидазы (в микромолях глюкозы в минуту на 1 мг белка) в сердечной мышце, печени и скелетных мышцах крысы при введении норадреналина и серотонина ($M \pm m$)

Исследованная ткань	Контроль	Норадреналин	Серотонин
Сердечная мышца	2,19±0,65 (44)	1,42±0,41* (34) $P=0,01$	2,67±0,92 (14)
Печень	6,92±0,80 (16)	5,53±0,91* (10) $P=0,05$	6,92±0,85 (10)
Скелетные мышцы	1,55±0,70 (16)	1,13±0,32 (12)	1,37±0,33 (12)

Гликогенсинтетаза. Удельная активность гликогенсинтетазы I в сердце и скелетных мышцах приблизительно одинакова и значительно выше, чем удельная активность обеих форм гликогенсинтетазы в печени. Во всех исследованных тканях меньше половины общей активности гликогенсинтетазы приходится на долю гликогенсинтетазы D (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Активность гликогенсинтетазы (в микромолях глюкозы в минуту на 1 г ткани) в сердечной мышце, печени и скелетных мышцах крысы при введении норадреналина и серотонина ($M \pm m$)

Исследованная ткань	Контроль		Норадреналин		Серотонин	
	I + D	I	I + D	I	I + D	I
Сердечная мышца	126,2±10,0 (10)	104,4±1,4 (8)	106,0±12,3 (10)	64,9±23,5* (10)	124,8±25,5 (10)	75,0±23,5* (10)
Печень	16,5±1,9 (10)	10,1±3,3 (10)	20,2±0,7 (10)	14,1±3,1 (10) $P=0,01$	19,8±2,1 (10)	15,0±3,9 (10) $P=0,05$
Скелетные мышцы	189,3±39,4 (10)	112,3±20,0 (10)	220,3±17,9 (8)	128,3±7,8 (8)	193,9±38,7 (10)	111,4±18,8 (10)

П р и м е ч а н и е. I — активность гликогенсинтетазы I; I + D — общая активность гликогенсинтетазы.

Под влиянием введения норадреналина и серотонина снижалась активность гликогенсинтетазы I в сердечной мышце, причем торможение под действием норадреналина было более выражено (см. табл. 3). В скелетных мышцах и печени статистически достоверных изменений в активности гликогенсинтетазы не было обнаружено.

Содержание гликогена. В связи с тем что система фосфорилазы у голодных животных в исследуемых тканях более чувствительна к действию адреналина и норадреналина, чем у сытых, в работе были использованы голодные животные. Было установлено, что после 17—18-часового голода-

ния концентрация гликогена резко падала в печени, в скелетных мышцах снижение было менее значительно, а в мышцах желудочков и предсердий концентрация гликогена, напротив, возрастала соответственно на 34 и 35 % (см. рисунок). Полученные данные хорошо согласуются с данными литературы [11, 12].

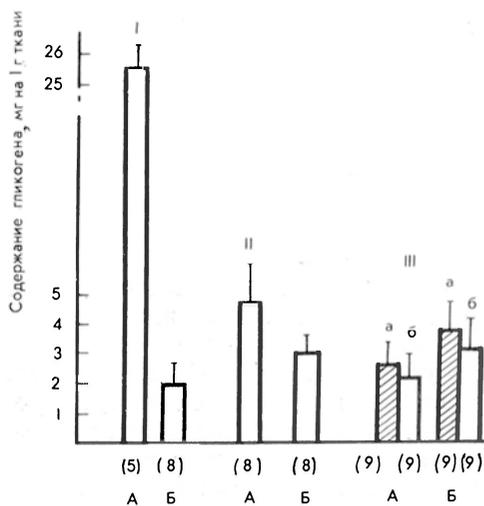
У голодных животных концентрация гликогена наиболее высока в сердце по сравнению с другими исследованными тканями, а у сытых — в печени. Более высокое содержание гликогена в сердце голодных животных по сравнению с сытыми можно рассматривать, по-видимому, как следствие создания одного из энергетических резервов для миокарда.

Введение голодным крысам норадrenalина и серотонина по-разному влияло на содержание гликогена в различных тканях. При введении норадrenalина наблюдали снижение концентрации гликогена в сердце приблизительно на 25 %, а при введении серотонина, наоборот, обнаруживали повышенные содержания его на 30 % (табл. 4). В скелетных мышцах не было выявлено статистически достоверных изменений содержания гликогена при введении обоих аминов. В печени при введении как норадrenalина, так и серотонина отмечалось значительное снижение концентрации гликогена — соответственно на 85 и 80 % (см. табл. 4), что согласуется с данными литературы [13, 14].

Активация фосфоролиза гликогена в сердечной мышце при введении норадrenalина сопровождается уменьшением распада гликогена под действием кислой α -глюкозидазы. Торможение гидролиза гликогена в лизосомах в этих условиях нам представляется возможным объяснить двумя причинами. Во-первых, норадrenalин и адреналин в опытах *in vivo* и *in vitro*, как известно, вызывают состояние тканевой гипоксии вследствие торможения процессов окислительного фосфорилирования [15, 16]. В этих условиях гликоген является одним из источников энергии для миокарда [17], и активация гликогенолиза в какой-то мере компенсирует недостаточность макроэргических соединений в миокарде [16]. Возможно, торможение гидролитического распада гликогена в лизосомах происходит вследствие «переключения» распада гликогена с одного пути на другой, по-видимому, более выгодный энергетически фосфоролитический путь, сопряженный с освобождением части необходимой энергии.

Во-вторых, активация фосфоролиза вызывает снижение концентрации гликогена в цитоплазме, что, вероятно, обуславливает уменьшение скорости поступления гликогена в лизосомы, а снижение в лизосомах концентрации субстрата реакции для кислой α -глюкозидазы — гликогена — может приводить к снижению активности этого фермента.

Введение серотонина вызывало в сердечной мышце активацию общей фосфорилазы и фосфорилазы А, не изменяло активность кислой α -глюкозидазы, снижало активность гликогенсинтетазы I, не меняя, однако, об-



Влияние 17—18-часового голодания на содержание гликогена в печени, скелетных мышцах и в мышцах желудочков и предсердий крысы.

I — печень; II — скелетные мышцы; III — сердце (а — желудочки, б — предсердия). А — сытые животные; Б — голодные животные. Цифры в скобках — число животных.

щую активность этого фермента, и сопровождалось повышением содержания гликогена. Как видно из табл. 3, серотонин вызывает повышение активности гликогенсинтетазы D, по-видимому, в результате частичного превращения формы I в форму D и, вероятно, за счет активации глюкозо-6-фосфатом. Этот факт, вероятно, и является причиной накопления гликогена в сердечной мышце в данных условиях.

Т а б л и ц а 4

Содержание гликогена (в мг на 1 г ткани) в сердечной мышце, печени и скелетных мышцах крысы при введении норадреналина и серотонина ($M \pm m$)

Исследованная ткань	Контроль	Норадреналин	Серотонин
Сердечная мышца	2,53±0,48 (8)	1,99±0,35* (8) $P=0,05$	3,33±0,66* (9) $P=0,01$
Печень	1,71±0,48 (8)	0,27±0,17* (7) $0,01 < P < 0,05$	0,33±0,20* (7) $0,01 < P < 0,05$
Скелетные мышцы	1,76±0,82 (8)	2,25±0,36 (8)	1,97±0,92 (8)

В печени резкое снижение содержания гликогена в ответ на введение норадреналина и серотонина происходит вследствие активации фосфоорилазы. Известно, что 4-часовое внутривенное введение норадреналина человеку также вызывало снижение содержания гликогена в печени, что было установлено при анализе ткани, полученной путем биопсии [13]. Содержание гликогена и активность фосфоорилазы в печени крысы при введении серотонина изменяются одинаковым образом как у сытых животных [14], так и у голодных (в наших опытах) независимо от способа введения амина. Активность кислой α -глюкозидазы в печени при введении норадреналина, по-видимому, снижается вследствие тех же причин, что и в сердечной мышце.

Как показали наши исследования, введение серотонина не вызывало изменения активности кислой α -глюкозидазы ни в сердце, ни в печени, ни в скелетных мышцах, в то время как во всех исследованных тканях наблюдали активацию фосфоорилазы. Известно, что серотонин активирует фосфоорилазу, воздействуя на активность аденилатциклазы [18]. По-видимому, регулирование активности кислой α -глюкозидазы происходит без участия цАМФ.

Авторы выражают благодарность профессору Е. Л. Розенфельд и профессору В. З. Горкину за обсуждение работы и ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Larner J. — *Circulat. Res.*, 1976, v. 38, № 5, Suppl. I, p. 2—6. — 2. Rosenfeld E. L., Popova I. A., Orlova V. S., — *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* 1970, v. 52, p. 1111. — 3. Hers H.-G. — *Advanc. metabol. Dis.*, 1964, v. 1, p. 1. — 4. Лукомская И. С., Городецкий В. К. — *Биохимия*, 1961, т. 26, с. 477. — 5. Lowry O. H., Rosebrough W. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265. — 6. Thomas J. A., Schlender K. K., Larner J. — *Analyt. Biochem.*, 1968, v. 25, p. 486. — 7. Golden S., Wals P. A., Katz J. — *Ibid.*, 1977, v. 77, p. 436. — 8. Gray G. A. — *Ibid.*, 1960, v. 1, p. 279. — 9. Good C. A., Kramer H., Somogyi M. — *J. biol. Chem.*, 1933, v. 100, p. 485. — 10. Abdul-lah M., Fleming J. D., Taylor P. M. et al. — *Biochem. J.*, 1963, v. 89, p. 35P. — 11. Jedeikin L. A. — *Ibid.*, 1966, v. 99, p. 6P—7P. — 12. Conlee R. K., Rennie M. J., Winder W. W. — *Am. J. Physiol.*, 1976, № 231, p. 614. — 13. Fröberg S. O., Hultman E. et al. — *Metabolism*, 1975, v. 23, p. 119. — 14. Levi-

ne R. A., Pesch L. A., Klatskin G. et al. — J. clin. Invest., 1964, v. 43, p. 797. — 15. Фатенков В. Н., Гриненко А. М., Фатенков Б. Н. — Кардиология, 1977, № 2, с. 123. — 16. Долгов В. В., Райкина М. Е., Антонов В. Ф. — В кн.: Биофизические основы патологического состояния мышц и энергетическое обеспечение сократительного аппарата. Тбилиси, 1973, с. 60. — 17. Evans G. — J. Physiol. (Lond.), 1934, v. 82, p. 468. — 18. Süegi J., Damjanovich S., Csaba B. — Biochim. biophys. Acta., 1968, v. 159, p. 545.

Поступила 5/1 1978г

EFFECT OF NORADRENALINE AND SEROTONIN ON GLYCOGEN METABOLISM IN RAT TISSUES

L. V. Rose, I. A. Popova

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

Effects of biogenic amines — noradrenaline and serotonin — on phosphorylase, acid α -glucosidase (γ -amilase), glycogen synthetase as well as on content of glycogen in rat liver tissue, heart and skeletal muscles were studied in vivo. Administration of noradrenaline and serotonin led to activation of phosphorylase in liver tissue, heart and skeletal muscles. Noradrenaline, administered into rats, caused a decrease in activity of acid α -glucosidase in heart and liver tissues and did not affect the enzymatic activity in skeletal muscles. Serotonin did not cause any effect on the activity of acid α -glucosidase in all the tissues studied. After administration of both amines inhibition of glycogen synthetase occurred in heart muscle, whereas the enzymatic activity was unaltered in skeletal muscles and liver tissue. Content of glycogen was decreased in heart muscle of the rats in which noradrenaline was administered. Content of glycogen was increased after serotonin administration in similar experiments. In liver tissue both amines caused a decrease in glycogen concentration and did not affect its content in skeletal muscles. Possible interrelationship is discussed between phosphorolysis and hydrolysis of glycogen under conditions of myocardial hypoxia, caused by noradrenaline administration.

УДК 612.74.015.11:612.8

В. М. Плесков, И. Б. Солитернова

О НЕРВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА РАЗЛИЧНО ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Изучали активность фосфорилазы, гексокиназы и пируваткиназы в растворимой фракции клеток различно функционирующих скелетных мышц интактных кроликов и животных с утраченной нервной импульсацией исследуемых мышц (денервация, экспериментальный аллергический полиневрит). Активность фосфорилазы растворимой фракции быстрой мышцы была в 2,2 раза выше, а гексокиназы — в 4 раза ниже по сравнению с активностью медленной мышцы. В результате денервации тканей эти различия сглаживались. При нарушении чувствительной иннервации в мышцах кроликов с экспериментальным аллергическим полиневритом наблюдалось такое же изменение активности гексокиназы, как при денервации.

В ряде исследований установлена важная роль гормонов в регуляции синтеза отдельных ферментных систем организма, существенным образом расширены представления о механизмах их действия на клеточные мембраны, показано аллостерическое влияние гормонов на конформацию ферментных белков [1—5]. В то же время не менее важная проблема нервного регулирования энергетического обмена выяснена недостаточно. Изучению этого вопроса посвящены работы В. С. Ильина и соавт., установивших важную роль нервной системы в регуляции синтеза ферментных белков и выдвинувших представление о биохимических основах нервной трофики [6—8]. Было показано, что денервированные мышцы по целому ряду признаков имеют значительное сходство с аналогичной тканью эмбриона с его несформировавшейся в структурном и функциональном отношении нервной систе-

мой. Это находится в полном соответствии с известными эволюционными концепциями Л. А. Орбели, подчеркивающим, что при анализе развития механизмов нервной регуляции в онтогенезе следует учитывать как развитие и дифференцировку структуры и функции самой нервной системы, так и все возрастающее в онто- и филогенезе влияние нервной системы на структурно-химическую организацию и функцию иннервируемых тканей [9].

Настоящая работа посвящена изучению роли нервной импульсации в регуляции активности ферментов энергетического обмена — гексокиназы, фосфорилазы и пируваткиназы — в клетках различно функционирующих скелетных мышц кроликов. Использование в качестве объекта исследования быстрой (икроножной) и медленной (камбаловидной) мышц в первую очередь обусловлено различным характером обмена указанных тканей: быстрая мышца характеризуется анаэробным обменом, медленная — аэробным. Таким образом, характер изменений активности ферментов энергетического обмена в интактных и денервированных тканях представляет существенный интерес для объяснения все возрастающего в фило- и онтогенезе влияния нервной импульсации на ферментные системы.

М е т о д и к а

В опытах использовали икроножную (*m. gastrocnemius*) и камбаловидную (*m. soleus*) мышцы кроликов-самцов массой 2,5—3,0 кг. Денервацию мышц осуществляли перерезкой седалищного нерва. Контролем на обездвиживание служили кролики с перерезанным ахилловым сухожилием. Животных брали в опыт через 3—4 нед после операции, так как именно в этот период отмечалось наиболее значительное снижение активности ряда ферментов, сохранявшиеся в течение 60 дней после денервации [10—12]. В качестве контроля использовали скелетные мышцы интактных кроликов. Для приготовления гомогената ткани растирали с кварцевым песком в 0,15 М КСl в соотношении 1 : 6. Растворимую фракцию тканей получали центрифугированием гомогенатов при 15 000 g в течение 40 мин. Для определения активности фосфорилазы а и суммарной фосфорилазы полученный супернатант разводили 0,1 М NaF в соотношении 1 : 18. Присутствие в среде ЭДТА и NaF тормозило взаимное превращение между двумя формами энзима и позволяло определять действительное содержание фосфорилазы а и общей фосфорилазы [13]. Активность фермента измеряли в направлении синтеза гликогена [14]. Неорганический фосфор определяли по Фиске — Суббароу. Активность фосфорилазы а измеряли без добавления АМФ в инкубационную среду, активность общей фосфорилазы — в присутствии АМФ и выражали в микрограммах неорганического фосфора (P_{in}) на 1 г ткани в 1 мин. Активность гексокиназы и пируваткиназы определяли спектрофотометрически [15] и выражали в микромолях продукта реакции на 1 мг белка или на 1 г ткани. Экспериментальный аллергический полиневрит (ЭАП) у кроликов вызывали введением им в подушечки лап выделенного нами из периферических нервов быка основного низкомолекулярного белка в дозе 5 мг на животное [16]. Содержание белка в пробах определяли микробиуретовым методом [17].

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

Как показали наши исследования (см. таблицу), активность фосфорилазы растворимой фракции быстрой (икроножной) мышцы была выше в 2,2 раза, а гексокиназы — в 4 раза ниже по сравнению с таковой медленной (камбаловидной) мышцы. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что икроножная мышца использует в качестве энергетического субстрата преимущественно гликоген (высокая активность фосфорилазы), в то время как камбаловидная мышца — глюкозу (высокая активность гексокиназы).

Выше отмечалось, что в медленных скелетных мышцах преобладает аэробный, а в быстрых — анаэробный обмен. Дополнительным подтверждением этого являются результаты изучения активности пируваткиназы указанных тканей. Оказалось, что активность этого фермента в икроножной мышце почти в 12 раз выше по сравнению с таковой в камбаловидной мышце.

В клетках различно функционирующих скелетных мышц с нарушенной в результате денервации импульсацией активность фосфорилазы а и гексокиназы изменялась неодинаково: если активность фосфорилазы а в растворимой фракции клеток икроножной мышцы снижалась на 40 %, то

активность гексокиназы этой же ткани возрастала почти в 3 раза. В клетках медленной мышцы активность фосфорилазы а практически не изменялась, тогда как активность гексокиназы снижалась (см. таблицу). Активность общей фосфорилазы значительно снижалась как в икроножной, так и в камбаловидной мышце (на 68 %). В денервированных скелетных мышцах кроликов снижалась также активность пируваткиназы, при этом в быстрой мышце снижение было выражено более резко по сравнению с медленной (55 и 23 % соответственно). Таким образом, в результате денервации сгла-

Влияние нарушения нервной импульсации на активность некоторых ферментов энергетического обмена различно функционирующих скелетных мышц кролика

Фермент	Условия опыта	Мышцы	
		камбаловидная	икроножная
Фосфорилаза а, мкг Р _{II} в 1 мин на 1 г ткани	Норма	51,9±4,33 (10)	63,4±6,95 (12)
	Денервация Р	48,4±6,93 (7)	39,6±4,16 (6) <0,01
Фосфорилаза а- -, б, мкмоль Р _{II} в 1 мин на 1 г ткани	Норма	480±47,2 (10)	1060±25 (12)
	Денервация Р	153±16,3 (7)	342±27,6 (7) <0,001
	Тендотомия Р	558±53,48 (4)	1000±43,4 (4)
Гексокиназа, мкмоль в 1 мин на 1 мг белка	Норма	1,1±0,032 (12)	0,288±0,025 (12)
	Денервация Р	0,710±0,072 (5)	0,690±0,043 (5) <0,001
	ЭАП Р	0,790±0,071 (7) <0,01	0,560±0,051 (7) <0,001
Пируваткиназа, мкмоль в 1 мин на 1 г ткани	Норма	147±6,49 (12)	1006±121 (12)
	Денервация Р	113±11,7 (8)	865±109 (8) <0,001
	Тендотомия Р	103±19,5 (3) <0,05	114±45 (4) <0,001

Примечание. В скобках — число опытов.

живались различия в активности ферментов быстрой и медленной мышц. Обращает на себя внимание отсутствие резких изменений активности фосфорилазы в растворимой фракции мышц с интактной нервной импульсацией, но атрофированных в результате тендотомии. На основании полученных данных можно сделать вывод, что нарушение иннервации приводит к резким изменениям ферментативной активности: различия в этом отношении между мышцами нивелируются и по характеру обмена они становятся похожими на мышцы эмбриона с его не сформировавшейся в структурном и функциональном отношении нервной системой.

Как известно, при перерезке седалищного нерва скелетные мышцы лишаются как афферентной, так и эфферентной (т. е. чувствительной и двигательной) импульсации, в результате чего ткани подвергаются резкой атрофии. Подобного рода закономерности не отмечались в мышцах кроликов с ЭАП [18]. Последний, воспроизводимый путем внутрикожной инъекции невритогенных белков в смеси со стимулятором Фрейнда, относится к истинным аутоиммунологическим заболеваниям нервной системы, имеющим по своим морфологическим и неврологическим проявлениям значительное сходство с заболеванием человека типа синдрома Гиллеина — Барре — Штроля. В этом отношении данная модель представляет существенный ин-

терес как для изучения нарушений обмена в тканях организма с нарушенной чувствительной иннервацией, так и для выяснения этиологии и патогенеза некоторых демиелинизирующих заболеваний нервной системы человека.

Трофические влияния на обмен могут реализоваться путем рефлекторных воздействий, первым звеном которых является центростремительная импульсация, вторым — функционирование нервных центров и третьим — эфферентная импульсация по центробежным нервам. Дистрофические изменения могут развиваться в результате нарушения любого из этих звеньев рефлекторной дуги [19].

Опыты показали, что в растворимой фракции различно функционирующих мышц кролика с ЭАП, т. е. при нарушении чувствительной иннервации, наблюдались аналогичные денервационным изменения активности гексокиназы. При этом необходимо отметить, что изменения активности гексокиназы в мышцах кроликов с ЭАП коррелировали с тяжестью клинического проявления заболевания и морфологической выраженностью демиелинизирующего процесса в спинальных, чувствительных ганглиях и их корешках. Полученные результаты свидетельствуют, что в результате деафферентации, как и при денервации, скелетные мышцы приобретают свойства (во всяком случае в отношении гексокиназы), аналогичные ткани эмбриона с его недостаточно развитой нервной системой. Особенно следует подчеркнуть корреляцию между выраженностью указанных изменений в мышцах и количеством утраченной информации о состоянии ткани.

Таким образом, представленные данные позволяют оценить значение иннервационных процессов в отношении регуляции активности ферментных систем у высших организмов [20].

ЛИТЕРАТУРА

1. Weber G., Singhal R. J., Srivastava S. K. — *Advanc. Enzym. Regulat.*, 1965, v. 3, p. 43—75. — 2. Codonas E., Kaji H., Park C. R., Rasmussen H. — *I. biol. Chem.*, 1961, v. 236, p. 63—64. — 3. Mirsky J. A., Perisutti G. — *Biochim. biophys. Acta*, 1962, v. 62, p. 490—496. — 4. Титова Г. В. — *Биохимия*, 1971, т. 36, № 5, с. 1083—1085. — 5. Ильин В. С., Ключева Н. Н. — *Вестн. АМН СССР*, 1976, № 9, с. 55—60. — 6. Ильин В. С., Емельянцева А. М., Комаров Г. П. и др. — *Ж. эволюц. биохим.*, 1972, № 3, с. 240—251. — 7. Ильин В. С., Плесков В. М., Разумовская Н. И. — В кн.: *Дистрофия миокарда*, Л., 1972, с. 57—68. — 8. Ilyin V. S., Razumovskaya N. I., Usatenko M. S. — *Advanc. Enzym. Regulat.*, 1974, v. 13, p. 219—234. — 9. Орбели Л. А. *Избранные труды*. Москва—Ленинград, 1961, т. 1, с. 214, 298. — 10. Nogan E. L., Dawson D. M., Romanul F. C. A. — *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1965, v. 13, p. 274—282. — 11. Телепнева В. И. — *Биохимия*, 1955, т. 20, № 2, с. 212—219. — 12. Huls H. N., Leonard S. L. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1961, v. 108, p. 224—228. — 13. Focesi A., Tahin Q. S., El-Quindy M. M. et al. — *Experientia (Basel)*, 1969, v. 25, p. 1243—1245. — 14. Желудкова З. П. — *Ж. эволюц. биохим.*, 1966, № 3, с. 193—195. — 15. Osterman J., Fritze P. J. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1973, v. 44—B, p. 1077—1085. — 16. Плесков В. М., Коновалов Г. В. — *Вопр. мед. химии*, 1975, № 4, с. 371—375. — 17. Itzaki R. F., Gill D. M. — *Analyt. Biochem.*, 1964, v. 9, p. 401—410. — 18. Плесков В. М. — *Вопр. мед. химии*, 1976, № 2, с. 233—237. — 19. Зайко П. И. — В кн.: *Многотомное руководство по патологической физиологии*. М., 1966, т. 4, с. 515—536. — 20. Ильин В. С. *Механизмы центрального регулирования обмена, их формирование в онтогенезе и нарушения при патологических состояниях организма*. М., 1966.

Поступила 9/1 1978 г.

ON THE NEURAL REGULATION OF ENZYMES OF ENERGY METABOLISM IN DISSIMILARLY ACTING RABBIT SKELETAL MUSCLES

V. M. Pleskov, I. B. Soliternova

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

Activities of phosphorylase, hexokinase and pyruvate kinase were studied in soluble fraction of cells from dissimilarly acting skeletal muscles of intact rabbits and from those tissues with impaired neural impulsation (denervation, experimental allergic neuritis). Activity

of phosphorylase was found to be 2.2-fold higher and of hexokinase — 4-fold lower in soluble fraction of quick muscle as compared with that of slow muscle. Due to denervation these differences were smoothed off. The same alterations in hexokinase activity were observed in muscles of rabbits with experimental allergic neuritis both after impairment of sensitive innervation and after denervation.

УДК 616.155.194.115-053.31-07:616.153.1:577.152.111

М. С. Усатенко, Г. И. Берлин

АКТИВНОСТЬ И ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ЭРИТРОЦИТАХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ С ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград, Ленинградский педиатрический медицинский институт

В сыворотке крови здоровых детей через 10 ч после рождения резко возрастает активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и НАД-зависимой малатдегидрогеназы (МДГ). Изоферментный спектр ЛДГ сдвигается в сторону повышения содержания ЛДГ₄ и ЛДГ₅ и снижения ЛДГ₁. Различия между изоферментным составом ЛДГ сыворотки и гемолизата у здоровых новорожденных в перинатальном периоде возрастают. При гемолитической болезни новорожденных высокая активность ЛДГ и МДГ в сыворотке крови определяется в момент рождения ребенка. Изоферментный спектр ЛДГ сыворотки больных детей в перинатальном периоде отличается от такового у здоровых высоким содержанием ЛДГ₁ и крайне низким содержанием ЛДГ₄ и ЛДГ₅. Различия между спектрами ЛДГ сыворотки и гемолизата у детей с гемолитической болезнью сглаживаются. Состав изоферментов МДГ сыворотки и гемолизата здоровых и больных новорожденных детей в перинатальном периоде не претерпевает существенных изменений.

В сыворотке крови новорожденных детей с гемолитической болезнью отмечается повышение активности лактатдегидрогеназы — ЛДГ (КФ 1.1.1.27) и малатдегидрогеназы — МДГ (КФ 1.1.1.37) по сравнению с активностью этих ферментов в сыворотке здоровых новорожденных [1—3]. Наиболее вероятными источниками ЛДГ и МДГ при гемолитической болезни новорожденных являются эритроциты и клетки печени [2]. Повышенный выход ферментов из клеток в сыворотку крови возможен даже при незначительных нарушениях проницаемости клеточных мембран, наблюдаемых у детей в первые сутки после рождения. Поэтому повышение активности ЛДГ и МДГ наряду с изменениями их изоферментных профилей могут быть использованы для наиболее ранней диагностики гемолитической болезни новорожденных [2]. Для выяснения вопроса об источнике повышенного содержания ферментов в сыворотке крови больных детей представляется целесообразным сопоставлением изоферментного состава дегидрогеназ в сыворотке крови и эритроцитах. В настоящей работе исследовали активность и изоферментный состав ЛДГ и МДГ в сыворотке крови и гемолизате детей в перинатальном периоде.

М е т о д и к а

У здоровых новорожденных детей кровь для исследования брали из пуповины (в момент рождения) и венепункцией через 10 ч после рождения и стабилизировали гепарином. Детям с гемолитической болезнью новорожденных через 10 ч после рождения производили заменное переливание крови. У них брали кровь из пуповины и в период наиболее выраженной желтухи, т. е. непосредственно перед заменным переливанием крови (10 ч после рождения), и по окончании заменного переливания крови (12 ч перинатального периода). Нами исследована кровь 22 здоровых новорожденных и 13 детей со средней и тяжелой формами гемолитической болезни.

После отсасывания сыворотки эритроциты трижды отмывали холодным изотоническим раствором хлористого натрия, рН которого был доведен до 7,4 с помощью 0,1 н. NaOH. Осаждение эритроцитов в процессе промывания производили центрифугированием их взвеси при 800 г в течение 10 мин. Затем брали 0,2 мл отмытых эритроцитов и помещали в 3,8 мл холодной дистиллированной воды. После полного лизиса клеток струму удаля-

ли центрифугированием гемолизата при 2000 g в течение 20 мин. Свободный от стромы гемолизат служил для определения активности ферментов. Активность ЛДГ и МДГ определяли спектрофотометрически по скорости окисления ПАД·Н₂. Предварительно выбирали оптимальные условия реакции. Состав инкубационных смесей приведен в работе [5]. Активность фермента выражали в единицах, рассчитанных на 1 мл сыворотки или гемолизата. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль ПАД за 1 мин при 25°C. Изоферментные спектры дегидрогеназ определяли в сыворотке и гемолизате посредством дискового электрофореза ферментов в полиакриламидном геле [6]. Количественный анализ электрофорограмм проводили на денситометре «Integrat Ch., Bender—Hobein» (Швейцария).

Результаты и обсуждение

Известно, что изоферменты ЛДГ содержатся в разных клетках организма в строго определенном процентном соотношении. Эритроциты содержат преимущественно ЛДГ₁ и ЛДГ₂, а клетки печени — ЛДГ₄ и ЛДГ₅. Концентрация ЛДГ и МДГ в клетках печени и эритроцитах во много раз превышает концентрацию этих ферментов в сыворотке крови [2].

Из табл. 1 видно, что в течение первых 10 ч после рождения в сыворотке крови здоровых детей значительно повышалась активность обеих

Таблица 1
Активность ЛДГ и МДГ в сыворотке крови здоровых детей и больных гемолитической болезнью новорожденных

Обследованные	Кровь	Число наблюдений	Активность ферментов, ед/мл		МДГ/ЛДГ
			ЛДГ	МДГ	
Здоровые дети	Пуповинная	22	295,0±21,7	40,2±3,3	0,14±0,01
	Кровь новорожденных через 10 ч после рождения	12	426,1±36,5	106,2±3,8	0,25±0,02
Больные гемолитической болезнью новорожденных	Пуповинная	13	525,5±54,2	109,3±14,9	0,21±0,01
	Кровь новорожденных: через 10 ч после рождения (до ЗПК)	13	665,9±35,0	112,7±14,5	0,17±0,005
	через 12 ч после рождения (после ЗПК)	13	467,2±37,7	76,5±10,0	0,16±0,01

Примечание. Здесь и в табл. 2 ЗПК — заменное переливание крови.

дегидрогеназ: ЛДГ — с 295,0 до 426,1 ед/мин, МДГ — с 40,2 до 106,2 ед/мл. Это повышение активности ферментов, по-видимому, связано с резким возрастанием их концентрации в клетках тканей, наблюдаемым при переходе млекопитающих от внутриутробного существования к внеутробному [7]. Коэффициент МДГ/ЛДГ в сыворотке здоровых новорожденных детей возрастал, что указывает на относительное преобладание выхода в сыворотку МДГ.

По данным авторов [1—3], у детей с гемолитической болезнью новорожденных высокая активность обеих дегидрогеназ определялась уже в первые минуты после рождения (в сыворотке пуповинной крови, см. табл. 1). Через 10 ч активность ЛДГ еще более возросла, а активность МДГ осталась на прежнем уровне. После заменного переливания крови (12 ч жизни) активность обоих ферментов в сыворотке крови детей с гемолитической болезнью новорожденных существенно снижалась.

Анализ изоферментного состава ЛДГ сыворотки крови и гемолизата (табл. 2) позволяет предположить вероятный источник повышенного содер-

жания этих дегидрогеназ в сыворотке крови новорожденных детей. У здоровых новорожденных в гемоллизате и сыворотке из пуповинной крови преобладающими изоферментами ЛДГ являются ЛДГ₁ и ЛДГ₂, на долю которых приходится более 65,5% от общей активности ЛДГ. Спектр гемоллизата сдвинут в сторону более высокого содержания ЛДГ₁ по сравнению со спектром ЛДГ сыворотки. Кроме того, в гемоллизате из пуповины отсутствует ЛДГ₅, тогда как в сыворотке пуповинной крови отчетливо выявляется 5 изоферментов ЛДГ.

За первые 10 ч жизни здоровых новорожденных изоферментный состав ЛДГ гемоллизата существенно не изменился, а в сыворотке повысилось со-

Т а б л и ц а 2

Состав изоферментов (в %) ЛДГ и МДГ гемоллизата и сыворотки крови здоровых детей и больных гемолитической болезнью новорожденных

Обследованные	Кровь	Исследуемый образец крови	ЛДГ					МДГ	
			ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅	ц-МДГ	м-МДГ
Здоровые дети	Пуповинная	Сыворотка	40,1	29,8	18,6	10,5	1,0	46,4	53,6
		Гемоллизат	56,4	30,6	10,5	2,5	0,0	32,8	64,2
	Кровь новорожденных через 10 ч после рождения	Сыворотка	34,7	30,7	17,3	14,3	3,0	48,0	52,0
		Гемоллизат	56,8	30,2	10,2	2,8	0,0	34,2	65,8
Больные гемолитической болезнью новорожденных	Пуповинная	Сыворотка	53,5	33,4	10,1	3,0	1,0	54,6	45,4
		Гемоллизат	55,0	32,1	9,8	3,1	0,0	36,4	63,6
	Кровь новорожденных: через 10 ч после рождения (до ЗПК)	Сыворотка	36,3	35,5	17,5	8,7	2,0	48,7	51,3
		Гемоллизат	50,2	29,6	14,9	4,9	0,0	32,7	67,3
		Сыворотка	40,6	40,0	14,1	3,8	1,5	57,5	42,5
		Гемоллизат	52,9	31,2	13,9	2,0	0,0	33,1	66,9
через 12 ч после рождения (после ЗПК)	Сыворотка								
	Гемоллизат								

Пр и м е ч а н и е. Число обследованных то же, что и в табл. 1. ц-МДГ — цитоплазматическая МДГ, м-МДГ — митохондриальная МДГ.

держание ЛДГ₄ и ЛДГ₅ и относительно снизилось содержание ЛДГ₁. В результате у здоровых детей различия между спектрами ЛДГ, сыворотки и гемоллизата за 10 ч постнатального развития стали еще более выраженными по сравнению с таковыми в пуповинной крови. Эти данные указывают, что у здоровых новорожденных эритроциты не являются основным источником повышения активности дегидрогеназ в сыворотке, наблюдаемого после рождения ребенка. Ввиду того что активность ЛДГ возрастает главным образом за счет катодных форм — ЛДГ₄ и ЛДГ₅, основным источником этого фермента в сыворотке здоровых детей являются клетки печени.

У детей с гемолитической болезнью, наоборот, повышение активности ЛДГ в сыворотке крови в момент рождения сопровождается сдвигом изоферментного спектра ЛДГ в сторону сближения его со спектром ЛДГ гемоллизата (см. табл. 2). Очевидно, высокая активность ЛДГ в сыворотке у этих детей обусловлена интенсивным гемолизом. В дальнейшем (10 ч жизни) различия между спектрами сыворотки гемоллизата у детей с гемолитической болезнью новорожденных, становятся более выраженными, однако в меньшей степени, чем у здоровых детей. Эти данные позволяют считать, что у детей с гемолитической болезнью новорожденных высокий уровень ЛДГ сыворотки крови в первые сутки постнатального развития обусловлен как гемолизом, так и возросшим выходом фермента из клеток печени и, возможно, других тканей.

Изоферменты МДГ сыворотки и гемолизата при электрофорезе в полиакриламидном геле были представлены двумя основными формами: более подвижной к аноду — ц-МДГ и менее подвижной — м-МДГ. В каждой из этих форм обнаруживалось наличие множественных ферментативно-активных полос — трех для ц-МДГ и двух для м-МДГ.

У всех исследованных детей в эритроцитах содержание м-МДГ было выше по сравнению с ц-МДГ (см. табл. 2).

В сыворотке крови активность обеих форм МДГ была примерно одинаковой. При гемолитической болезни новорожденных существенных изменений в соотношении обеих форм МДГ в гемолизате и сыворотке крови не отмечено.

Таким образом, определение общей активности ЛДГ, МДГ и изоферментного состава ЛДГ сыворотки крови представляется существенным для ранней диагностики гемолитической болезни новорожденных. Особенно большую информативную ценность в этом отношении имеет сопоставление изоферментных спектров ЛДГ сыворотки крови и гемолизата новорожденных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова Т. З. — *Вопр. охр. мат.*, 1970, № 1, с. 17.—2. Юрков Ю. А.— В кн.: *Проблемы медицинской химии*. М., 1973, с. 37. — 3. Доронравов А. В.— В кн.: *Всесоюзный съезд детских врачей. 10-й. Материалы*. М., 1974, с. 108. — 4. Wroblewski W., La Due J. S. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1955, v. 90, p. 210. — 5. Усатенко М. С. — *Бнохимия*, 1977, т. 42, с. 311. — 6. Dietz A. A., Lubrano T. — *Analyt. Biochem.*, 1967, v. 20, p. 246. — 7. Herrmann H., Tootle M. — *Physiol. Rev.*, 1964, v. 44, p. 289.

Поступила 9/1 1978 г.

ACTIVITIES AND ISOZYME SPECTRA OF LACTATE AND MALATE DEHYDROGENASES IN BLOOD SERUM AND RED BLOOD CELLS OF NEWBORN CHILDREN WITH HEMOLYTIC DISEASE

M. S. Usatenko, G. I. Berlin

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

Activities of lactate dehydrogenase (LDH) and NAD-dependent malate dehydrogenase (MDH) were considerably increased in blood serum of healthy children within the first 10 hrs after their birth. Content of LDH₄ and LDH₅ isoenzymes was increased, along with a decrease in LDH₁ content, in blood serum. Differences in LDH isozyme spectra between blood serum and hemolysate in healthy newborns became more distinct within the perinatal period. In blood serum of newborns with hemolytic disease high activity of LDH and MDH was found immediately after birth. As distinct from healthy children, high content of LDH₁ and very low concentrations of LDH₄ and LDH₅ were observed in blood serum of the impaired children within the perinatal period. The dissimilarity in LDH spectra became less distinct in blood serum and hemolysate of children with hemolytic disease. The composition of MDH isoenzymes was not distinctly altered in blood serum and hemolysate of both healthy and impaired newborn children within the perinatal period.

УДК 615.332.015.42:612.35.015.3

В. А. Арбузов

ДЕГРАДАЦИЯ мРНК МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ И СВОБОДНЫХ ПОЛИРИБОСОМ В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ КРЫС НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ АКТИНОМИЦИНА D И ЦИКЛОГЕКСИМИДА

Лаборатория энзимологии АМН СССР, Москва

Показано, что на фоне действия актиномицина D происходит разрушение мРНК как мембраносвязанных, так и свободных полирибосом в клетках печени крыс; при этом скорость разрушения мРНК свободных полирибосом выше таковой мембраносвязанных полирибосом. Циклогексимид препятствовал разрушению мРНК обоих классов полирибосом. В свободных полирибосомах стабилизирующее действие циклогексимида на

мРНК было выражено в меньшей степени. При увеличении времени действия актиномицина D отмечалось уменьшение удельной радиоактивности мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом печени. При одновременном введении крысам актиномицина D и циклогексимида удельная радиоактивность мРНК обоих классов полирибосом не изменялась. Предполагается существование двух фракций мРНК, отличающихся по стабильности как в мембраносвязанных, так и в свободных полирибосомах клеток печени крыс.

Вопрос о взаимоотношении мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом в клетках эукариотов остается невыясненным. Было показано [1], что при действии актиномицина D в течение 12 ч отмечалось разрушение свободных полирибосом клеток печени мышей, в то время как мембраносвязанные полирибосомы сохранялись. Эти результаты были интерпретированы как доказательство того, что мембраносвязанные и свободные полирибосомы печени содержат разные классы мРНК, отличающиеся по стабильности [2]. С другой стороны, определение времени жизни ($T_{ж}$) мРНК мембраносвязанных полирибосом печени без использования актиномицина D показало, что она обменивается довольно быстро ($T_{ж}$ равно $3\frac{1}{2}$ ч) [3]. Сопоставление этих результатов позволяет предположить, что актиномицин D способствует стабилизации мРНК мембраносвязанных полирибосом в клетках печени. Действительно, имеются данные, что актиномицин D препятствует разрушению мРНК суммарных полирибосом в печени крыс [4, 5]. Однако механизмы стабилизации полирибосомной мРНК печени на фоне действия актиномицина D не выяснены.

В настоящей работе было исследовано влияние актиномицина D и циклогексимида на деградацию мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом в клетках печени крыс.

М е т о д и к а

В работе использовали крыс-самцов линии Вистар массой 140—160 г. Крысам вводили внутривенно актиномицин D (фирма «Reanal», Венгрия) из расчета 0,5 мг на 1 кг массы для подавления синтеза рибосомных РНК и через 1 ч по 45 мкКи $2\text{-}^{14}\text{C}$ -оротата (удельная радиоактивность 0,2 м Ки/мг). Через 30 мин после введения ^{14}C -оротата животным вводили 2,5 мг/кг актиномицина D для полного подавления синтеза РНК или актиномицин D вместе с 100 мг/кг циклогексимида (фирма «Calbiochem»). Крыс забивали через $2\frac{1}{2}$ и 5 ч после введения ингибиторов. Изолированную печень после измельчения гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в двух объемах 0,05 М трис-НСI-буферного раствора рН 7,6, содержащего 0,005 М Mg Cl_2 , 0,025 М КСI (ТКМ-буфер) и 0,25 М сахарозу. Гомогенат центрифугировали при 15 000 г в течение 15 мин. Надосадочную жидкость (фракция S-15) использовали для получения мембраносвязанных и свободных полирибосом [6]. Для этого фракцию S-15 наслаивали на двухступенчатый сахарозный градиент, состоящий из 3 мл 2 М сахарозы и 1 мл 0,5 М сахарозы, приготовленных на ТКМ-буфере. Центрифугирование в сахарозном градиенте проводили при 105 000 г в течение 4 ч (ротатор 50 Ti). Мембраносвязанные и свободные полирибосомы собирали отдельно, суспендировали в ТКМ-буфере и центрифугировали при 120 000 г в течение $1\frac{1}{2}$ ч. Осадки полирибосом суспендировали в ТКМ-буфере, обрабатывали дезоксихолатом натрия (конечная концентрация 1,2%) и центрифугировали через слой (3 мл) 1 М сахарозы, приготовленной на ТКМ-буфере, при 105 000 г в течение 2 ч (ротатор 50 Ti). Осадки полирибосом суспендировали в ТКМ-буфере и использовали для определения содержания РНК и подсчета радиоактивности. Количество РНК определяли по методу Монро и Флека [7]. Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Wallak».

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

Из табл. 1 видно, что при 5-часовом действии актиномицина D отмечается уменьшение количества как мембраносвязанных, так и свободных полирибосом в клетках печени крыс. При этом содержание мембраносвязанных полирибосом в расчете на 1 г ткани уменьшается на 33 %, а свободных полирибосом — на 58 % по сравнению с контролями. Эти данные свидетельствуют о том, что на фоне действия актиномицина D происходит разрушение обоих классов полирибосом печени, но свободные полирибосомы разрушаются с большей скоростью. При одновременном введении крысам актиномицина D и циклогексимида содержание мембраносвязанных поли-

рибосом печени было практически таким же, как в контроле, что говорит о стабилизирующем действии циклогексимида на мембраносвязанные полирибосомы. Содержание свободных полирибосом при совместном действии обоих ингибиторов меньше, чем в контроле, но больше, чем при действии одного актиномицина D. По-видимому, циклогексимид стабилизирует и свободные полирибосомы в клетках печени, хотя и в меньшей степени, чем мембраносвязанные полирибосомы.

В табл. 2 представлены результаты опытов по влиянию названных ингибиторов на обмен предварительно меченой мРНК двух классов полирибосом печени. Как видно, содержание радиоактивной мРНК в мембрано-

Таблица 1

Содержание полирибосом в печени крыс при 5-часовом действии актиномицина D и комбинации его с циклогексимидом

Тип полирибосом	Условия опыта	Количество полирибосом	
		мг на 1 г печени	%
Мембраносвязанные	Контроль	3,7	100
	Актиномицин D	2,48	67
	Актиномицин D + циклогексимид	3,33	90
Свободные	Контроль	2,0	100
	Актиномицин D	0,84	42
	Актиномицин D + циклогексимид	1,4	70

Примечание. Количество полирибосом мембраносвязанных и свободных полирибосом в контроле принято за 100%.

связанных и свободных полирибосомах в расчете на 1 мг РНК фракции S-15 уменьшается при увеличении времени действия актиномицина D, причем в свободных полирибосомах это уменьшение выражено в большей степени. Эти данные показывают, что скорость исчезновения мРНК из свободных полирибосом клеток печени на фоне действия актиномицина D больше, чем из мембраносвязанных полирибосом. При одновременном действии актиномицина D и циклогексимида в течение 2¹/₂ и 5 ч количество радиоактивной мРНК мембраносвязанных полирибосом остается таким же, как в контроле. В то же время количество радиоактивной мРНК свободных полирибосом при совместном действии ингибиторов уменьшалось в течение 2¹/₂ ч. При увеличении времени действия ингибиторов до 5 ч количество радиоактивной мРНК свободных полирибосом остается практически таким же, как и при 2¹/₂-часовом действии ингибиторов.

Для объяснения полученных данных (см. табл. 1 и 2) можно предположить по крайней мере две возможности: 1) на фоне действия актиномицина D происходит разрушение мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом, а циклогексимид препятствует такому разрушению; 2) при действии актиномицина D не происходит деградации мРНК, но она исчезает из полирибосом, например, за счет ингибирования инициации трансляции этим антибиотиком, как это было показано для клеток HeLa [8]. В этом случае часть мРНК переходит в фонд мРНК-частиц цитоплазмы, а часть матриц, остающихся в составе полирибосом, должна быть менее «нагруженной» рибосомами. При действии циклогексимида, который ингибирует движение рибосом вдоль мРНК, содержание мРНК в полирибосомах, а также количество последних должны оставаться такими же, как и в контроле, что и наблюдалось в наших опытах (см. табл. 1 и 2).

Ранее было показано [5], что количество радиоактивной мРНК во фракции S-15, полученной из клеток печени крыс, значительно уменьша-

лось при увеличении времени действия актиномицина D. При одновременном введении крысам актиномицина D и циклогексимида содержание радиоактивной мРНК и полирибосом в цитоплазме клеток печени оставалось таким же, как и в контроле [5]. Эти данные являются прямым доказательством того, что на фоне действия актиномицина D происходит разрушение мРНК, а следовательно, и полирибосом в клетках печени, а циклогексимид препятствует такому разрушению.

Сопоставление этих данных с результатами настоящей работы позволяет считать, что уменьшение количества мембраносвязанных и свободных

Т а б л и ц а 2

Радиоактивность мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом печени крыс на фоне действия актиномицина D и комбинации его с циклогексимином

Условия опыта	Время действия ингибиторов, ч	Тип полирибосом	Радиоактивность мРНК		Удельная радиоактивность мРНК	
			мкКв на 1 мг РНК фракции S ₁₅	%	мкКв на 1 мг РНК полирибосом	%
Контроль	—	Мембраносвязанные	7,1	100	10,5	100
		Свободные	5,0	100	7,5	100
Актиномицин D	2 ¹ / ₂	Мембраносвязанные	5,82	82	7,66	73
		Свободные	3,16	63	6,5	87
	5	Мембраносвязанные	4,83	68	5,94	56
		Свободные	2,4	48	5,0	67
Актиномицин D + циклогексимид	2 ¹ / ₂	Мембраносвязанные	6,82	96	10,07	96
		Свободные	3,6	72	7,1	95
	5	Мембраносвязанные	6,89	97	10,7	102
		Свободные	4,0	80	8,25	110

П р и м е ч а н и е. Радиоактивность мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом в контроле приняты за 100%. Отношение радиоактивности мРНК к количеству РНК полирибосом здесь и в тексте условно обозначено как удельная радиоактивность полирибосомной мРНК.

полирибосом (см. табл. 1) и содержания в них мРНК (см. табл. 2) при действии актиномицина D обусловлено именно разрушением мРНК. В то же время циклогексимид задерживает разрушение мРНК как мембраносвязанных, так и свободных полирибосом печени, причем в последнем случае стабилизирующее действие циклогексимида выражено в меньшей степени.

Радиоактивность полирибосомной мРНК, рассчитанная на 1 мг РНК полирибосом (условно «удельная радиоактивность» мРНК) при разрушении матриц должна оставаться постоянной (если в процессе деградации «нагруженность» мРНК рибосомами не изменяется) или увеличиваться (если мРНК при разрушении оказывается менее «нагруженной» рибосомами). Однако, как видно из табл. 2, удельная радиоактивность мРНК мембраносвязанных полирибосом печени крыс уменьшается при увеличении времени действия актиномицина D. В свободных полирибосомах также отмечается уменьшение удельной радиоактивности мРНК, но в меньшей степени. Если бы все молекулы мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом печени при введении крысам ¹⁴C-орота на 30 мин (см. методику) были помечены в равной степени, то удельная радиоактивность мРНК полирибосом при ее разрушении не должна была изменяться. Уменьшение удельной радиоактивности мРНК полирибосом при действии актиномицина D (см.

табл. 2) скорее всего свидетельствует о том, что мембраносвязанные и свободные полирибосомы клеток печени содержат по крайней мере по две фракции мРНК, различающиеся по стабильности. При этом часть молекул мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом метится за 30 мин (фракция быстрометящейся РНК) и разрушается на фоне действия актиномицина D, в то время как другая фракция мРНК обоих классов полирибосом при введении крысам ^{14}C -оротата остается помеченной и, по-видимому, является более стабильной. Использование такого же методического подхода позволило выявить фракцию стабильных и лабильных перирибосомных ядерных РНК в клетках печени [9].

Ранее было показано существование в клетках печени трех классов мРНК, отличающихся по стабильности [10]. При этом два класса мРНК были обнаружены в составе свободных полирибосом, а третий класс — в составе мембраносвязанных полирибосом. Данные, представленные в настоящей работе, позволяют предполагать, что и в составе мембраносвязанных полирибосом клеток печени существует по крайней мере две фракции мРНК, отличающиеся по стабильности — лабильная и стабильная. В связи с этим интересно отметить, что в клетках печени обнаружено два класса мембраносвязанных полирибосом, различающихся в функциональном отношении [11]: 1) полирибосомы, участвующие в синтезе экспортируемых белков; 2) полирибосомы, синтезирующие внутриклеточные белки. Два класса мембраносвязанных полирибосом в печени обнаружены также по различию в характере их связи с мембранами эндоплазматического ретикулаума. При этом первый класс полирибосом связан с мембранами за счет 60 S-рибосомных субчастиц [12], а второй класс полирибосом — за счет мРНК [13].

Обращает на себя внимание факт (см. табл. 2), что удельная радиоактивность мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом печени при одновременном введении крысам актиномицина D и циклогексимида остается такой же, как и в контроле. Эти данные могут свидетельствовать о том, что циклогексимид препятствует разрушению быстрометящейся мРНК обоих классов полирибосом в клетках печени.

Таким образом, результаты, представленные в настоящей работе, показывают, что на фоне действия актиномицина D происходит разрушение мРНК как мембраносвязанных, так и свободных полирибосом в клетках печени крыс. В то же время ингибирование белкового синтеза циклогексимидом приводит к стабилизации мРНК обоих классов полирибосом печени.

И, наконец, возникает вопрос о причинах меньшей скорости разрушения мРНК мембраносвязанных полирибосом по сравнению с таковой свободных полирибосом в клетках печени на фоне действия актиномицина D. Этому факту можно дать несколько объяснений: мембраносвязанные полирибосомы содержат более стабильные мРНК, чем свободные полирибосомы [1, 2]; актиномицин D препятствует разрушению мРНК мембраносвязанных полирибосом, не влияя при этом на скорость деградации мРНК свободных полирибосом [14]; на фоне действия актиномицина D происходит разрушение мРНК обоих классов полирибосом, но предшествующие в цитоплазме клеток печени мРНК-частицы [15] переходят в мембраносвязанные полирибосомы с большей скоростью, чем в свободные полирибосомы. В этом случае включение мРНК-частиц в мембраносвязанные полирибосомы при действии антибиотика и будет создавать впечатление большей стабильности мРНК данного класса полирибосом. Эта возможность кажется вполне вероятной, так как показано, что актиномицин D не препятствует переходу цитоплазматических мРНК-частиц в полирибосомы в клетках печени [16].

Можно надеяться, что дальнейшие более детальные исследования позволят окончательно выяснить этот вопрос.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sarma D. S. R., Reid J. M., Sidransky H. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1969, v. 30, p. 682. — 2. Reid J. M., Sarma D. S. R., Sidransky H. — Lab. Invest., 1971, v. 25, p. 141. — 3. Любимова Е. В., Черновская Т. В., Сидорова Е. В. и др. — Докл. АН СССР, 1976, т. 226, с. 463. — 4. Endo Y., Tomioka H., Natori Y. — Biochem. biophys. Acta, 1971, v. 240, p. 215. — 5. Арбузов В. А. — Биохимия, 1978, т. 44, № 5. — 6. Улоуата К., Оло Т. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 281, p. 125. — 7. Минго Н. Н., Флесск А. — Analyst, 1966, v. 91, p. 78. — 8. Singer R. H., Репман С. — Nature, 1972, v. 240, p. 100. — 9. Шапот В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М., 1975, с. 251. — 10. Подобед О. В., Брыкина Е. В., Абакумова О. Ю. и др. — Молекулярная биол., 1974, № 6, с. 936. — 11. Арбузов В. А. Успехи совр. биол., 1977, т. 42, с. 338. — 12. Blobel G. — Acta biol. med. germ., 1974, Bd 33, S. 711. — 13. Cardelli J., Long B., Pitot H. C. — J. Cell. Biol., 1976, v. 70, p. 47. — 14. Арбузов В. А. — Биохимия, 1977, т. 42, с. 338. — 15. Hershaw E. C. — J. molec. Biol., 1968, v. 36, p. 401. — 16. Лейтин В. Л., Подобед О. В., Лерман М. И. — Докл. АН СССР, 1971, т. 201, с. 490.

Поступила 18/1 1978 г.

DEGRADATION OF mRNA FROM MEMBRANE-BOUND AND FREE POLYRIBOSOMES IN CELLS OF LIVER OF RATS PRETREATED WITH ACTINOMYCIN D AND CYCLOHEXIMIDE

V. A. Arbusov

Laboratory of Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Actinomycin D caused degradation of mRNA both in membrane-bound and in free polyribosomes from rat liver cells. The rate of mRNA destruction was distinctly higher in free polyribosomes, than in membrane-bound ones. Cycloheximide inhibited the mRNA destruction in both types of polyribosomes. At the same time, the stabilizing effect of cycloheximide on mRNA was less distinct in free polyribosomes. A decrease in specific radioactivity of mRNA from membrane-bound and free polyribosomes was observed after prolonged pretreatment with actinomycin D. The specific radioactivity of mRNA from polyribosomes of both types was not altered after simultaneous administration of actinomycin D and cycloheximide into rats. Occurrence of two fractions of mRNA, dissimilar in stability, is possible both in membrane-bound and in free polyribosomes from rat liver cells.

УДК 612.648-08:612.342.4]-019

М. П. Черников, В. Р. Николаевская, Е. Я. Стан

АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА И ХИМОТРИПСИНА В ПЕРИОД РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ КРЫС

Институт питания АМН СССР, Москва

Исследовали активность трипсина и химотрипсина в поджелудочной железе и химусе трех отделов тонкого кишечника крыс разного возраста. В первые 4 дня жизни крыс наблюдается значительное снижение содержания химотрипсиногена и повышение содержания трипсиногена в поджелудочной железе. В период от 4 до 20 дней жизни отмечается почти такое же высокое содержание трипсиногена и химотрипсиногена в поджелудочной железе, как у 30-дневных животных, находящихся на дефинитивном питании. Активность трипсина и химотрипсина в дуоденальном содержимом равна таковой у 30-дневных животных, находящихся на дефинитивном питании. Активность панкреатических протеаз в химусе тощей кишки почти не изменяется в течение первых 20 дней жизни, а у 30-дневных крыс возрастает в 2 раза. Активность трипсина и химотрипсина в химусе подвздошной кишки значительно увеличивается с возрастом. Наибольшая активность панкреатических протеаз наблюдается в химусе подвздошной кишки. Полученные данные свидетельствуют, что у новорожденных крыс происходит достаточно интенсивное полостное переваривание белков молока.

До настоящего времени остается открытым вопрос о механизмах, лежащих в основе высокой эффективности утилизации белков молока в ранний постнатальный период развития. Некоторые авторы склонны полагать, что ранний возраст характеризуется слабым развитием пищеварительной системы [1, 2]. Имеются и прямо противоположные данные, согласно ко-

торым ранний возраст характеризуется относительно высоким уровнем развития протеолитической системы пищеварения [3, 4].

Целью данного исследования явилось изучение особенностей становления панкреатических протеиназ в раннем возрасте. Для этого мы исследовали активность трипсина и химотрипсина как в поджелудочной железе, так и в содержимом разных отделов тонкого кишечника.

Методика

Все исследования проводили на крысах линии Вистар в возрасте 3, 12, 20 и 30 дней. Животным не давали пищи в течение 3 ч и после часового кормления забивали. Тонкий кишечник освобождали от окружающих тканей, делили на двенадцатиперстную, тощую и подвздошную кишку и перфузировали холодной бидистиллированной водой. Содержимое отделов тонкого кишечника лиофилизировали. Крысы 30-дневного возраста служили контролем. Они голодали 6 ч и получали в пищу желудочное содержимое 2-дневных животных. Для определения активности протеаз в поджелудочной железе ткань железы крыс го-

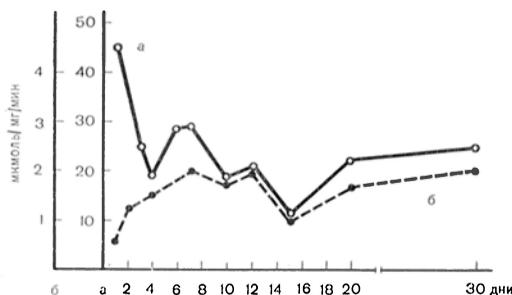


Рис. 1. Возрастные изменения активности химотрипсина (а) и трипсина (б) в поджелудочной железе крыс.

Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — возраст животных (в днях); по оси ординат — удельная активность (в мкмоль/мг/мин).

могенизировали в 0,15 М NaCl, содержащем 0,1% тритон X-100. Активность трипсина и химотрипсина определяли методом автоматического титрования на автотитраторе (фирмы «Radiometer» (Дания) с использованием синтетических субстратов: бензоиларгинин этилового эфира (БАЭЭ) и ацетилтирозин этилового эфира (АТЭЭ) [5].

Активацию трипсиногена и химотрипсиногена в гомогенате поджелудочной железы проводили трипсином в течение 24 ч при 0°C [6]. Белок определяли методом Лоури [7].

Результаты и обсуждение

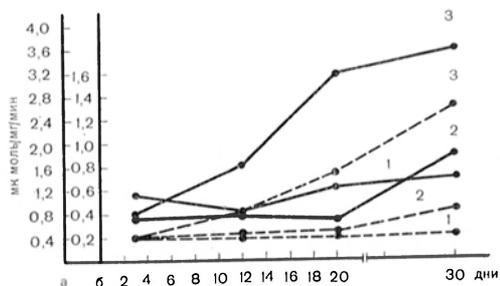
В первые сутки после рождения активность трипсина в поджелудочной железе была низкая (рис. 1). В последующие дни отмечается ее прогрессивное повышение с переходом в широкий, плоский пик, охватывающий период с 4-го по 12-й день жизни. К 15-му дню наблюдается почти двукратное снижение активности с последующим возрастанием к 20-му дню. Однако и у 30-дневных крыс активность трипсина держится на том же уровне, что и у 7—12-дневных животных. Динамика изменения активности химотрипсина в поджелудочной железе очень сходна с изменением активности трипсина, за исключением первых 4 дней жизни (см. рис. 1). В первые сутки активность химотрипсина очень высокая — в 2 раза выше 30-дневной и резко снижается в течение последующих 3 дней жизни, а затем снова нарастает к 7-му дню постнатального периода развития. К 15-му дню периода молочного вскармливания наблюдается снижение активности химотрипсина в 2 раза по сравнению с 7-дневной. После 15-го дня отмечается прогрессивное нарастание активности химотрипсина, но даже и на 30-й день она не превышает уровня активности в поджелудочной железе 7-дневных животных. Наблюдается параллельное изменение содержания трипсиногена и химотрипсиногена в поджелудочной железе в период с 4-го по 30-й день жизни (см. рис. 1). Резкое снижение активности химотрипсина и повышение активности трипсина в течение первых 4 дней жизни связано, по-видимому, с адаптивными перестройками при переходе животных от эмбрионального к постнатальному периоду развития. Некоторое повышение активности трипсина и химотрипсина с 15-го по 30-й день жизни связано, по-

видимому, с изменением состава пищи. Полученные результаты свидетельствуют, что содержание протеолитических зимогенов в период молочного вскармливания находится почти на таком же уровне, как у 30-дневных крыс, перешедших на дефинитивное питание.

Однако определение активности протеиназ в поджелудочной железе еще не свидетельствует об интенсивности их секреции. В связи с этим представлялось важным провести сравнительное определение активности трипсина и химотрипсина в химусе различных отделов тонкого кишечника, с тем чтобы судить об интенсивности переваривания белков молока.

Активность трипсина (рис. 2) в содержимом двенадцатиперстной и тощей кишки не изменяется в период с 3-го по 12-й день жизни и очень не-

Рис. 2. Возрастные изменения активности химотрипсина (а) и трипсина (б) в содержимом двенадцатиперстной (1), тощей (2) и подвздошной (3) кишки. Сплошные линии — возрастные изменения активности химотрипсина; прерывистые — трипсина.



значительно возрастает у 20-дневных животных. К 30-му дню жизни наблюдается незначительное нарастание активности в дуоденальном содержимом и почти двукратное — в содержимом тощей кишки. Наиболее интенсивное увеличение активности трипсина с возрастом наблюдается в химусе подвздошной кишки. Активность трипсина в химусе подвздошной кишки 20-дневных крыс в 3, а у 30-дневных в 7 раз выше, чем у 3-дневных животных (см. рис. 2).

Активность трипсина в содержимом подвздошной кишки гораздо выше, чем в химусе двенадцатиперстной и тощей кишки, на протяжении всего периода исследования и превышает активность в этих отделах у 12-дневных крыс в $1\frac{1}{2}$ раза, у 20-дневных крыс в $2\frac{1}{2}$ раза и у 30-дневных в $3\frac{1}{2}$ раза.

Возрастные изменения активности химотрипсина в дуоденальном содержимом очень незначительны. Отмечается некоторое снижение активности химотрипсина у 12-дневных крыс и очень незначительное увеличение у 20-дневных животных, которое не изменяется до 30-дневного возраста. В содержимом тощей кишки активность химотрипсина не изменяется у 3- и 12-дневных крыс, несколько снижается у 20-дневных и возрастает в 2 раза у 30-дневных животных. Возрастные изменения активности химотрипсина в содержимом подвздошной кишки наиболее выражены по сравнению с таковой химуса двенадцатиперстной и тощей кишки. Так, у 12-дневных животных она в 2 раза, а у 20-дневных крыс в 4 раза выше активности химотрипсина в содержимом подвздошной кишки 3-дневных крыс (см. рис. 2).

Таким образом, активность как трипсина, так и химотрипсина в содержимом тощей кишки почти не изменяется в течение периода молочного вскармливания (20 дней жизни), а к 30-дневному возрасту — в связи с переходом к дефинитивному питанию — возрастает в 2 раза.

Возрастные изменения активности панкреатических протеаз в дуоденальном содержимом, по-видимому, связаны с возрастными изменениями содержания зимогенов в поджелудочной железе. Так, характер возрастных изменений активности химотрипсина в дуоденальном содержимом коррелирует (см. рис. 2) с возрастными изменениями содержания химотрипсиногена в поджелудочной железе (см. рис. 1).

Полученные результаты согласуются с данными других авторов [8], которые показали, что активность химотрипсина в поджелудочной железе

крыс перед рождением в 5—8 раз выше, чем у взрослых животных. Показано [9], что у новорожденных поросят, забитых до приема материнского молока, не происходит освобождения панкреозимина, который стимулирует секрецию трипсиногена поджелудочной железой. Активность химотрипсина в железе у новорожденных поросят, напротив, высока [9]. Панкреозимин стимулирует секрецию трипсиногена в несколько раз, но медленно увеличивает секрецию химотрипсиногена [9]. Содержание трипсиногена в ткани железы, низкое при рождении, в дальнейшем возрастает, достигая максимума на 10-й день постнатального развития [6]. Содержание химотрипсиногена, очень высокое при рождении, снижается в течение первых дней жизни крыс и в дальнейшем не изменяется [6]. Эти данные согласуются с полученными нами результатами. По данным литературы [1], активность трипсина и химотрипсина в поджелудочной железе крыс низкая при рождении и остается на таком же уровне до 18-го дня жизни, а затем возрастает.

Сравнение полученных нами данных по распределению активности трипсина и химотрипсина между содержимым трех отделов тонкого кишечника показывает, что наибольшая активность всегда (за исключением 3-дневного возраста) отмечается в химусе подвздошной кишки, что, по-видимому, объясняется обогащением содержимого подвздошной кишки протеазами вследствие переваривания и всасывания белков.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что как образование протеолитических зимогенов в панкреасе, так и активность их в дуоденальном содержимом в период молочного вскармливания (20 дней жизни) находится почти на таком же уровне, как у 30-дневных животных. Снижение содержания химотрипсиногена в поджелудочной железе и активности химотрипсина в дуоденальном содержимом в течение 4 дней после рождения связано с переходом от эмбрионального к постнатальному периоду развития. Переход от молочного к смешанному и от смешанного к дефинитивному питанию сопровождается некоторым нарастанием содержания протеолитических зимогенов в поджелудочной железе. Переход от смешанного к дефинитивному питанию после 20 дней жизни сопровождается возрастанием активности трипсина и химотрипсина в химусе тощей кишки в 2 раза. Полученные данные свидетельствуют о том, что у новорожденных крыс имеется достаточно развитая протеолитическая система, обеспечивающая интенсивное полостное переваривание белков молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Corring T., Lutmaître A. — *Ann. Biol. anim.*, 1970, v. 10, p. 431—441.
2. Herbst J. J., Sunshine P. — *Pediat. Res.*, 1969, v. 3, p. 27—33.
3. Tyson R. — *Am. J. Surg.*, 1969, v. 117, p. 876—890.
4. Silverio J. — In: *Nutrition Proceedings of the 9th International Congress of Nutrition*. Basel, 1975, p. 139—147.
5. Walsh K. A., Wilcox P. E. — *Meth. Enzymol.*, 1970, v. 19, p. 37—38.
6. Robberecht P., Deschodt-Lanckman J., Camus J. — *Am. J. Physiol.*, 1971, v. 221, p. 376—381.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265—275.
8. Sanders T., Rutter W. — *Ibid.*, 1974, v. 240, p. 3500—3509.
9. Gorrill D., Friend W. — *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 1970, v. 48, p. 745—750.

Получила 18/1 1978 г.

ACTIVITIES OF TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN AT EARLY POSTNATAL DEVELOPMENT OF RATS

M. P. Chernikov, V. R. Nikolaevskaya, E. Ya. Stan

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

Activities of trypsin and chymotrypsin were studied in pancreas as well as in chyme from three departments of small intestine of rats of various age. Distinct decrease in content of chymotrypsinogen and increase in content of trypsinogen were observed in pancreas at first four days of rat life. In pancreas content of trypsinogen and chymotrypsinogen was as high in 4-20 days old rats as that one in 30-days old animals, maintained at definitive diet. Acti-

vity of trypsin and chymotrypsin was the same in duodenal contents of rats of both these groups. Activity of pancreatic proteinases was almost unaltered in chyme of jejunum intestine within first 20 days of life; it was twice increased to 30-days age. Trypsin and chymotrypsin were distinctly activated in chyme of ileum intestine with ageing. The highest activity of pancreatic proteinases was observed in chyme of ileum intestine. The data obtained suggest that rather intensive cavitary digestion of milk protein occurs in newborn rats.

УДК 612.82.015.1:577.152.361.042.2:612.824.1

В. В. Розжанец, М. Ш. Промыслов, Н. И. Габриэлян, О. И. Щербанева

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ЛИКВОРА НА АКТИВНОСТЬ НАТРИЙ-, КАЛИЙ- АТФ-азы СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ

Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям химических соединений, Купавна, Московская область, Институт нейрохирургии им. Н. С. Бурденко, Москва, Институт трансплантации органов и тканей АМН СССР, Москва

Люмбальный ликвор (спинномозговая жидкость) различных больных в разведении 1:10 является сильным ингибитором натрий-, калий-АТФ-азы мембранных препаратов, выделенных из головного мозга быка и крысы; на активность магний-АТФ-азы он не влияет. Степень ингибирования натрий-, калий-АТФ-азы не зависит от характера заболевания донора спинномозговой жидкости, а также от вида животного, использованного для выделения мембранного препарата. Тщательный диализ спинномозговой жидкости против раствора Кребса — Рингера приводит к исчезновению ингибирующего эффекта. Делается вывод о наличии в спинномозговой жидкости эндогенного ингибитора натрий-, калий-АТФ-азы, способного регулировать ее активность in vivo.

Активность натрий-, калий-АТФ-азы (Na, K-АТФ-азы) нервных и глиальных клеток является чувствительным функциональным показателем, изменяющимся при различных физиологических и патологических состояниях центральной нервной системы. В настоящее время предпринимаются попытки связать характер изменения активности этого фермента при различных химических и физических воздействиях in vivo и in vitro с отдельными стадиями физиологических процессов, а также с различными звеньями патогенеза психических заболеваний [1---3]. Совершенно очевидно, что для правильной интерпретации данных, полученных с помощью подобных экспериментальных моделей, необходим учет разнообразных процессов регуляции активности Na, K-АТФ-азы в живом организме. Такие процессы могут осуществляться с участием эндогенных регуляторов, локализованных как внутри клеток, так и во внеклеточной среде. Одной из биологических жидкостей, имеющих в ряде случаев непосредственный контакт с поверхностью нервных и глиальных клеток [4, 5], является люмбальный ликвор, или спинномозговая жидкость (СМЖ). Действие этой жидкости на Na, K-АТФ-азу нервных клеток до сих пор не изучено.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния СМЖ, полученной от различных больных, на активности Na, K-АТФ-азы и магний-АТФ-азы (Mg-АТФ-азы) мембранных препаратов, выделенных из головного мозга животных.

Методика

Фракции неочищенных синаптических мембран (НСМ) и очищенных синаптических мембран (СМ) выделяли из больших полушарий головного мозга крыс по модифицированному методу де-Робертиса, после осмотического шока и отделения от синаптических пузырьков осадок, содержащий синаптические мембраны, митохондрии и миелин, суспендировали (2—3 мг белка на 1 мл) в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,6 при 25°C и использовали в качестве фракции НСМ. Фракцию суммарных синаптических мембран после осаждения суспендировали (1 мг белка на 1 мл) в том же трис-НСI-буфере и использовали в качестве фракции СМ. Очищенный мембранный препарат (ОМП), выделенный из коры головного мозга крупного рогатого скота по модифицированному методу Скоу [6], был любезно предоставлен нам А. А. Болдыревым (биологический факультет Московского университета). Данный

препарат, имеющий высокую активность Na, K-АТФ-азы, практически не обладал активностью Mg-АТФ-азы. Мембранные препараты АТФ-азы хранили при -10°C ; препараты НСМ и СМ — не более 1 нед, препараты ОМП — не более 5 нед. При хранении активность Na, K-АТФ-азы уменьшалась на 20—30%. Препараты сыворотки крови и СМЖ больных с заболеваниями печени были получены из Института трансплантации органов и тканей АМН СССР, препараты СМЖ нейрохирургических больных — из Института нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко АМН СССР. Препарат СМЖ крыс, находившихся под эфирным наркозом, был любезно предоставлен член-корр. АМН СССР проф. Г. Н. Крыжановским (Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР). Все препараты биологических жидкостей хранили при -10° от 1 до 6 нед. В I серии опытов к 0,9 мл среды для определения активности АТФ-азы добавляли по 0,1 мл биологических жидкостей. Во II серии опытов к 0,85 мл среды добавляли по 0,15 мл неразбавленной или разбавленной СМЖ. Контрольные пробы в I серии содержали 0,1 мл воды, во II серии — 0,15 мл модифицированного [7] раствора Кребса — Рингера. Этот же раствор использовали во II серии опытов для разбавления и диализа СМЖ. Диализ проводили против 300—400 объемов раствора при 4°C в течение 18 ч; контрольные препараты СМЖ, не подвергавшиеся диализу, хранили в это время при той же температуре. Инкубационная смесь для определения активности АТФ-азы содержала в конечном объеме 1,0 мл (без учета веществ, вносимых с биологическими жидкостями или раствором Кребса — Рингера): NaCl — 100 ммоль, KCl — 20 ммоль, MgCl_2 — 6,3 ммоль, АТФ-Na₂ — 3,0 ммоль, трис-HCl-буфер pH 7,6 при 25°C — 50 ммоль, белок мембранных препаратов — 10—20 мкг (для ОМП) или 50—200 мкг (для СМ и НСМ). Пробы для определения Mg-АТФ-азы содержали, кроме того, 0,5 мМ уабаина. После 10-минутной преинкубации в присутствии мембранных препаратов и биологических жидкостей реакцию начинали добавлением 50 мкл нейтрализованного препарата АТФ. Через 10—20 мин инкубации с АТФ при 37°C реакцию останавливали, переносили пробирки в ледяную баню с одновременным добавлением 1,0 мл 10% ТХУ. После отделения белков количество ортофосфата в пробах определяли с помощью модифицированного [8] метода Лоури — Лопца. Концентрацию белка определяли по Лоури. Использовались соли х. ч. или ч. д. а., а также препараты АТФ фирмы «Reanal» (Венгрия) и уабаина фирмы «Sigma» (США). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В I серии опытов исследовали действие сыворотки крови больных с заболеваниями печени на активность Na, K-АТФ-азы ОМП (результаты в таблице не указаны). Сыворотка крови 2 больных, находившихся в состоянии печеночной комы, подавляла активность фермента на 38 ± 6 и $17 \pm 10\%$ соответственно. Количество исследованных препаратов сыворотки крови, полученных от этих больных в разные сроки госпитализации, составило 6 и 3 соответственно. Сыворотка крови 3 других больных, не находившихся в состоянии комы (по одному препарату от каждого больного), в наших экспериментах не влияла на активность Na, K-АТФ-азы ОМП. В отличие от сыворотки крови СМЖ первого из исследованных коматозных больных подавляла активность Na, K-АТФ-азы ОМП практически полностью (табл. 1). Для того чтобы выяснить, не является ли наблюдаемый эффект данного препарата СМЖ результатом специфических нарушений при коме, мы исследовали действие на Na, K-АТФ-азу ОМП и СМ препаратов СМЖ, полученных от различных нейрохирургических больных. Как следует из табл. 1, практически все препараты СМЖ значительно подавляют активность Na, K-АТФ-азы как ОМП, так и СМ. Более того, существенных различий в эффекте СМЖ, полученных от больных с различными диагнозами, мы не обнаружили. На основании приведенных данных мы заключили, что в отличие от сыворотки крови СМЖ способна значительно подавлять активность Na, K-АТФ-азы мембранных препаратов, выделенных от головного мозга различных животных; это свойство СМЖ, по видимому, не зависит от заболевания доноров. В этой связи во II серии опытов мы использовали смесь СМЖ различных нейрохирургических больных. Как видно из табл. 2, действие СМЖ на Na, K-АТФ-азу фракции НСМ является специфичным: активность Mg-АТФ-азы в этих опытах достоверно не изменяется.

По сравнению с данными табл. 1 обращает на себя внимание более низкая степень ингибирования Na, K-АТФ-азы. Возможно, это отличие объясняется значительной примесью митохондрий и миеллина во фракции НСМ.

Тщательный диализ СМЖ против раствора Кребса — Рингера приводит к практически полному исчезновению ингибирующего эффекта. По-видимому, это не связано с температурной инактивацией эндогенного ингибитора (или ингибиторов) СМЖ, так как контрольный препарат СМЖ во время диализа

Т а б л и ц а 1

Влияние СМЖ различных больных на Na, К-АТФ-азу ОМП коры головного мозга быка и СМ головного мозга крыс

Диагноз	Препарат Na, К-АТФ-азы	% ингибирования Na, К-АТФ-азы	n
Печеночная кома	ОМП	90 (80—100)	2
	СМ	64	1
Травма головного мозга	ОМП	100	1
	СМ	100	1
Опухоль головного мозга (до операции)	ОМП	57 (43—70)	2
	ОМП	90 (84—96)	2
	СМ	30	1
Опухоль головного мозга (после операции)	ОМП	96 (91—100)	2
	ОМП	43	1
	СМ	64	1
	СМ	67 (64—70)	2
Окклюзионная гидроцефалия	ОМП	99 (98—100)	2
Невралгия слухового нерва	СМ	91	1
Не установлен	СМ	98	1

Пр и м е ч а н и е. Приведены величины ингибирования Na, К-АТФ-азы в процентах, вычисленные на основании 3 параллельных измерений в I серии опытов (см. методику). В тех случаях, когда исследовали действие двух препаратов СМЖ, полученных от одного больного в разные сроки госпитализации, приведены средние значения, а в скобках указан разброс значений. n — число препаратов СМЖ, полученных от одного больного. Активность Na, К-АТФ-азы в этих опытах составляла для ОМП 72 ± 18 мкмоль P_H на 1 мк белка за 1 ч (n=7), для СМ 28 ± 7 мкмоль P_H на 1 мг белка за 1 ч (n=3).

находился при той же температуре. Кроме того, специальными опытами мы показали, что при длительном хранении и многократном замораживании и оттаивании ингибирующая способность смеси СМЖ существенно не умень-

Т а б л и ц а 2

Влияние смеси СМЖ различных нейрохирургических больных на активности Na, К-АТФ-азы фракции НСМ головного мозга крыс

СМЖ	Объем СМЖ, добавленной к 1 пробе, мл	Число опытов	Активность АТФ-азы, мкмоль P_H на 1 мг белка за 1 ч		Торможение Na, К-АТФ-азы, %
			Mg-АТФ-аза	Na, К-АТФ-аза	
Недиализованная	0	7	$10,1 \pm 1,6$	$2,7 \pm 0,5$	
	0,075	6	$10,3 \pm 1,4$	$1,2 \pm 0,3^*$	55
	0,15	7	$10,1 \pm 1,5$	$1,0 \pm 0,2^*$	63
Отдиализованная	0,075	6	$10,3 \pm 1,4$	$2,2 \pm 0,2$	15
	0,15	7	$10,3 \pm 1,4$	$2,3 \pm 0,4$	19

* Значение достоверно отличается от контроля ($P < 0,05$).

шается. Результаты, полученные в этой серии опытов, позволяют предполагать, что эндогенный ингибитор Na, К-АТФ-азы, находящийся в СМЖ, не является высокополимерным соединением.

Для того чтобы ответить на вопрос, может ли описанный эффект СМЖ наблюдаться в «гомогенной» системе, содержащей СМЖ и СМ одного вида животного, мы исследовали влияние смеси СМЖ, полученной от 6 здоровых крыс, находившихся под эфирным наркозом, на Na, K-АТФ-азу СМ головного мозга крыс. В условиях, соответствующих II серии опытов, добавление к инкубационной смеси 0,05 мл этой СМЖ подавляло активность Na, K-АТФ-азы на 46%. Более подробные исследования в такой «гомогенной» системе затрудняются из-за чрезвычайно небольшого количества СМЖ, которое можно получить от одной крысы.

Суммируя полученные результаты, мы можем заключить, что СМЖ самых различных животных, как и СМЖ крысы, способна специфически ингибировать активность Na, K-АТФ-азы использованных мембранных препаратов; содержащийся в СМЖ ингибитор (ингибиторы), по-видимому, не является высокополимерным соединением. Мы предполагаем, что в живом организме активность Na, K-АТФ-азы синаптических (а возможно, и глиальных) мембран может быть значительно ниже, чем это наблюдается *in vitro*. Не исключено, что действие различных патогенных и фармакологических агентов на этот фермент может быть опосредовано через систему эндогенных ингибиторов, находящихся в СМЖ или в межклеточной жидкости головного мозга.

Авторы глубоко признательны член-корр. АМН СССР проф. Г. Н. Крыжановскому за ценные замечания при обсуждении данной работы, а также В. Бузову за помощь в выполнении ее экспериментальной части.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1976, т. 11, с. 137.
2. Сараджишвили П. М., Геладзе Т. Ш. Эпилепсия. М., 1977.
3. Schwartz A., Lindenmayer G. E., Allen J. C. — *Pharmacol. Rev.*, 1975, v. 27, p. 3.
4. Фридман А. П. Основы ликворологии. Л., 1971.
5. Delank H. W. *Das Eiweißbild des Liquor Cerebrospinalis und seine klinische Bedeutung*. Darmstadt, 1965.
6. Kłodos I., Ottolenghi P., Boldyrev A. — *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 67, p. 397.
7. Родина В. И., Рожанец В. В., Крыжановский Г. Н. и др. — Докл. АН СССР, 1977, т. 234, с. 235.
8. Рожанец В. В., Крыжановский Г. Н., Козлова В. П. и др. — *Биохимия*, 1978, т. 43, вып. 5, с. 998—1004.

Поступила 8/11 1978 г.

INHIBITORY EFFECT OF LIQUOR CEREBROSPINALIS ON THE ACTIVITY OF Na,K-ATPase FROM MAMMALIAN BRAIN SYNAPTIC MEMBRANES

V. V. Rozhanets, M. S. Promislov, N. I. Gabrielyan, O. I. Sherbanjova

Institute of Biological Testing of Chemicals, Moscow Region, Cupavna,

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

Liquor cerebrospinalis, obtained from patients with various diseases, inhibited Na,K-ATPase from rat and bovine synaptic membranes and did not influence on the activity of Mg-ATPase. The inhibition was independent on the type of disease. The inhibitory effect of liquor cerebrospinalis disappeared after dialysis of it against Krebs-Ringer solution. Liquor cerebrospinalis appears to contain an endogenous inhibitor of synaptic Na,K-ATPase, which controls the enzymatic activity *in vivo*.

Ю. М. Лопухин, М. А. Беркович, Н. Н. Пятницкий, А. И. Арчаков,
А. А. Гуляев, В. И. Сергиенко

ЭКСТРАКЦИЯ ХОЛЕСТЕРИНА ИЗ СТЕНКИ СОСУДА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ И ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

} *II Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Поверхностно-активные вещества — твин-20, тритон X-100, дезоксихолат натрия — в низких концентрациях (0,1—1,0%) обладают способностью экстрагировать от 20 до 40% холестерина из стенки аорты собаки. Экстрагирующее действие диоксана обнаруживается лишь при его высоких концентрациях (80—100%). В отличие от диоксана этанол в низких концентрациях (10—20%) способен экстрагировать до 20% холестерина. Утолщенная интима сосуда, пораженного атеросклерозом, является значительным препятствием для экстракции холестерина.

Известно, что при атеросклерозе внутренняя стенка артерии обогащается жироподобными веществами, в частности холестерином. Благодаря выраженной гидрофобности холестерина в сосудистой стенке метаболически неактивен и плохо растворим в тканевой жидкости. Эффективный способ лечения на последних стадиях болезни — хирургический. Он заключается в удалении из внутренней полости сосуда атеросклеротических бляшек вместе со слоем интимы или удалении пораженного участка и замене его сосудистым протезом [1—3].

Мы предположили, что возможно химическое извлечение избыточного холестерина и липопротеидов из сосудов, пораженных атеросклерозом, с помощью растворов, содержащих смешанные с водой мягкие органические растворители или поверхностно-активные вещества (ПАВ). Задачей нашего исследования служило изучение возможности извлечения холестерина из сосудистой стенки диоксаном, этиловым спиртом и растворами ПАВ с целью подбора наиболее подходящих условий для экстракции холестерина из стенки сосуда. Для региональной перфузии сосудов в экстрагирующей смеси важно использовать ПАВ в минимальных концентрациях, извлекающие холестерин из сосудистой стенки.

М е т о д и к а

Аорты собак разрезали вдоль на полоски массой 1 г. Каждую полоску помещали в колбу, куда приливали по 10 мл экстрагирующей смеси. Колбы подвергали механическому встряхиванию в течение 16 ч при комнатной температуре. Полоску ткани удаляли из колбы и высушивали в вакуумном сушильном шкафу до постоянного веса. Экстрагирующую смесь испаряли в ротационном испарителе или лиофилизаторе, а сухой остаток растворяли в хлороформе. Концентрацию извлеченного из сосудистой стенки холестерина определяли описанным методом [4]. Содержание холестерина в стенке аорты, по отношению к которому определяли процентное извлечение, найдено методом [5, 6]. Для этилового спирта и твина-20 изучена кинетика экстракции холестерина в интервалах времени 20 мин — 24 ч.

В реальных условиях холестериновые отложения отделены от перфузирующего раствора интимой, значительно утолщенной при атеросклерозе. В другой серии экспериментов определялась возможность экстракции холестерина через интиму из стенки пораженной атеросклерозом аорты человека. Аорты с явными признаками атеросклероза от трунов людей разрезались на прямоугольники площадью 3 см². Адвентиция и поверхности срезов обшивались полиэтиленовой пленкой, чтобы предотвратить их контакт с исследуемым раствором. В контрольных опытах образцы аорты пленкой не обшивались.

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

Среднее содержание холестерина в стенке аорты собаки составило в наших экспериментах 110 мг на 1 г ткани.

В табл. 1 и 2 приведены средние данные трех опытов по извлечению холестерина из сосудистой стенки растворами диоксана и этилового спирта.

Как видно из табл. 1 и 2, диоксан в концентрациях до 60 % не извлекает холестерин из стенки аорты. Сильное экстрагирующее действие наблюдается только при концентрациях диоксана от 80 до 100 %. При использовании этанола наблюдается совершенно иная зависимость между количеством экстрагируемого холестерина и концентрацией спирта. Холестерин экстрагируется из стенки сосуда разведенными растворами этанола (10—20 %).

Т а б л и ц а 1

Извлечение холестерина из сосудистой стенки диоксаном

Концентрация диоксана в растворе, %	Концентрация холестерина в растворе, мг на 100 мл	% извлечения
20	0	0
40	0	0
60	0	0
80	6,7	61
100	10,7	97

Т а б л и ц а 2

Извлечение холестерина из сосудистой стенки этиловым спиртом

Концентрация этанола в растворе, %	Концентрация холестерина в растворе, мг на 100 мл	% извлечения
10	1,3	12
20	2,2	20
40	2,1	19
60	6,3	57
80	9,6	87
100	10,8	98

Чистые диоксан и спирт извлекают холестерин из сосудистой стенки практически полностью.

В табл. 3 суммированы данные по экстрагирующему действию изученных ПАВ. В интервале концентраций 0,1—1,0 % все эти детергенты явля-

Т а б л и ц а 3

Извлечение холестерина из сосудистой стенки растворами ПАВ

Концентрация ПАВ в растворе, %	Концентрация холестерина в растворе ПАВ, мг на 100 мл		
	твин-20	тритон X-100	дезоксихолат натрия
0,1	2,0	2,0	1,8
0,2	2,0	2,4	2,2
0,5	3,0	3,8	2,0
1,0	4,0	4,0	3,6

ются эффективными экстрагентами холестерина. При сравнении изученных детергентов видно, что при концентрации 0,1 % твин-20, тритон X-100 и дезоксихолат натрия извлекают около 20 % холестерина из сосудистой стенки. При повышении концентрации ПАВ до 1,0 % экстрагируется около 40 % всего холестерина из стенки сосуда.

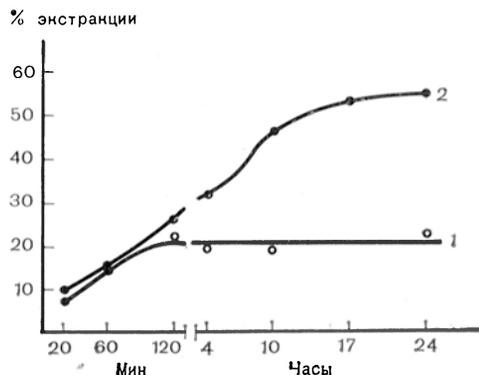
В следующей серии опытов исследовалась кинетика экстракции холестерина из сосудистой стенки 0,1 % твином-20 и 60 % этиловым спиртом. Как видно из рисунка, уже через 20 мин твин-20 и этиловый спирт экстрагируют около 10 % всего холестерина из сосудистой стенки, а спустя 4 ч — 21 и 32 % соответственно.

На основании полученных данных можно думать, что в сосудистой стенке существуют два фонда холестерина. Один из них легко экстрагируется при низких концентрациях ПАВ и этилового спирта и составляет, вероятно, около 20 % всего холестерина сосуда. Другой фонд — это холестерин, экстрагируемый только при высоких концентрациях органических растворителей.

В серии опытов, когда исследуемые растворы контактировали только с поверхностью интимы, пораженной атеросклерозом аорты человека, исследования показали, что 0,1% раствор твина-20 холестерин практически не экстрагирует. 1% раствор твина-20 экстрагирует не более 0,05% холестерина ткани сосуда. При исследовании водных растворов этилового спирта в концентрации 10—60% количество холестерина в пробах составляло 1—3%

Кинетика экстракции холестерина из аорты собаки 0,1% раствором твина-20 (1) и 60% этиловым спиртом (2).

Условия опыта: инкубационная смесь содержала 10 г ткани сосуда и 100 мл экстрагирующего раствора. Для определения холестерина отбирали по 10 мл. По горизонтали — время; по вертикали — процент экстракции холестерина в расчете от общего содержания его в стенке сосуда.



от его количества в стенке сосуда. 90% спирт экстрагировал до 6% исходного холестерина.

В контрольной группе опытов этой серии, когда исследуемые растворы контактировали не только с интимой, но и с адвентицией и с поверхностью срезов, степень экстракции холестерина всеми исследованными растворами была значительно выше и составляла 29% для 90% этанола.

Это говорит о том, что утолщенная интима является значительным препятствием для экстракции холестерина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петровский Б. В. — Грудная хир., 1977, № 5, с. 8—13.
2. Покровский А. В., Гаштэв А. Х. — Там же, с. 48—55.
3. Кириллов Ю. Б., Булатова А. Н., Пашуков Е. Н. и др. — Там же, № 1, с. 28—29.
4. Mrskos A., Touarek J. — Cas. Lek. ces., 1958, v. 97, p. 191—195.
5. Schoneheimer R. et al. — Z. physiol. Chem., 1930, Bd 192, S. 73—111.
6. Sprague W. M., Webb M. — J. biol. Chem., 1950, v. 187, p. 97—100.

Поступила 28/II 1978 г.

EXTRACTION OF CHOLESTEROL FROM VESSEL WALL BY SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES AND ORGANIC SOLVENTS

Yu. M. Lopukhin, M. A. Berkovich, N. N. Pyatnitsky, A. I. Archakov, A. A. Guliaev, V. I. Sergienko

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Low concentrations (0.1-1.0%) of surface-active substances Tween-20, Triton X-100 and sodium deoxycholate were shown to extract 20-40% of cholesterol from dog vessel wall. Dioxane was effective at high concentrations (80-100%). As contrast to dioxane, ethanol extracted up to 20% of cholesterol at low concentrations (10-20%).

The thickened intima of the atherosclerotic vessel is the significant barrier for the extraction of cholesterol.

М. В. Замараева, А. И. Гагельганс, Б. А. Ташмухамедов

О ВЛИЯНИИ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА КАЛЬЦИЕВЫЙ НАСОС САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Отдел биофизики Института биохимии АН Узбекской ССР, Ташкент

Добавление тироксина in vitro тормозит аккумуляцию Ca^{2+} фрагментами саркоплазматического ретикулума, изолированного из скелетных мышц кролика. Ингибирующий эффект тироксина обусловлен его прямым действием на Ca^{2+} -зависимую АТФ-азу. Полу максимум торможения фермента наблюдался в одинаковом диапазоне концентраций тироксина при использовании как мембраносвязанной, так и высокоочищенной солилизированной формы Са-АТФ-азы (15—20 и 10 мкМ гормона соответственно). Аналогичным эффектом обладал трийодтиронин, но не дийодтирозин, не проявляющий гормональной активности. Высказывается предположение о влиянии тиреоидных гормонов на механизм дефосфорилирования в АТФ-гидролазной реакции.

В литературе имеются данные о связи миопатий с состоянием транспорта Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме скелетных мышц животных при повышенном или пониженном уровне тиреоидных гормонов [1, 2]. Не исключено, что этот эффект, как и в ряде других случаев [3], обусловлен реализацией нескольких механизмов: влиянием гормонов на синтез белков, проницаемость мембран или прямым действием на каталитическую активность мембраносвязанных ферментов.

С целью оценки непосредственно мембранных эффектов гормонов щитовидной железы нами в настоящей работе исследовано в условиях *in vitro* влияние тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3) на аккумуляцию Ca^{2+} и активность АТФ-азы саркоплазматического ретикулума скелетных мышц кролика.

М е т о д и к а

Саркоплазматический ретикулум скелетных мышц кролика выделяли по Мак-Ленлану [4]. Аккумуляцию Ca^{2+} исследовали методом рН-метрии [5] в среде инкубации, содержащей 100 мМ КСl, 10 мМ трис-хлорида рН 7,4, 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ АТФ и около 100 мкг белка на 1 мл. По ходу записи в ячейку объемом 4 мл вносили 5 мМ оксалата калия и $CaCl_2$ (по 200 нмоль в добавке).

Солилизированный препарат Са-АТФ-азы саркоплазматического ретикулума получали по методу Мак-Леннана [4] или Икэмото [6]. При диск-электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [7] выявлялась основная полоса Са-АТФ-азы и примесные количества протеолипида. Активность АТФ-азы оценивали по приросту в среде неорганического фосфата, определяемого описанным ранее методом [8]. Среда инкубации для определения активности АТФ-азы саркоплазматического ретикулума содержала 50 мМ трис-хлорида рН 7,5, 100 мМ КСl, 2, мМ $CaCl_2$, 2 мМ ЭГТА, 5 мМ оксалата калия, 5 мМ АТФ, 5 мМ $MgCl_2$. При измерении активности солилизированной Са-АТФ-азы использовали среду, содержащую 50 мМ трис-хлорида рН 7,5, 100 мМ КСl, 5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ АТФ, $2 \cdot 10^{-6}$ — $5 \cdot 10^{-6}$ М $CaCl_2$; контрольные пробы содержали дополнительно 1 мМ ЭГТА; реакцию останавливали добавлением ТХУ до конечной концентрации 5%. Количество белка определяли по методу Лоури [9]. Определение активности АТФ-азы во всех случаях проводили при 37°C.

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

Оценка некоторых параметров функционального состояния саркоплазматического ретикулума может быть проведена по регистрации кинетики гидролиза АТФ методом рН-метрии [5]. В частности, скорость экстра-расщепления АТФ при внесении в среду Ca^{2+} коррелирует со скоростью его аккумуляции в саркоплазматическом ретикулуме, а величина Ca^{2+}/H^+ , эквивалентная отношению Ca^{2+}/ATP , характеризует эффективность кальциевого насоса саркоплазматического ретикулума, т. е. количество аккумулярованных ионов Ca^{2+} при гидролизе 1 молекулы АТФ. Максимальному сопряжению транспорта Ca^{2+} с гидролизом АТФ соответствует отношение

$\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$, равное 2 [10]. Однако оно уменьшается, например, при увеличении проницаемости мембран саркоплазматического ретикулула или в зависимости от уровня ионизированного Ca^{2+} в среде.

Как видно на рис. 1, T_4 тормозит скорость экстра-расщепления АТФ, увеличивая в $1\frac{1}{2}$ —2 раза время, необходимое для аккумуляции 200 нмоль Ca^{2+} . Следовательно, тироксин *in vitro* является ингибитором кальциевого насоса, что согласуется с выполненным нами ранее прямым измерением аккумуляции ^{45}Ca в присутствии T_4 [11]. Однако в дополнение к изотопным исследованиям метод рН-метрии позволяет дифференцировать влияние гормона на проницаемость мембран фрагментов саркоплазматического ретикулула от прямого эффекта на Ca-АТФ-азу — основной компонент кальциевого насоса саркоплазматического ретикулула. Действительно, торможение аккумуляции Ca^{2+}

в последнем может явиться следствием увеличения проницаемости его мембран для Ca^{2+} , в результате чего энергозависимый поток Ca^{2+} внутрь везикул уравновешивается оттоком Ca^{2+} наружу по концентрационному градиенту. Транспортное отношение $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$ при этом уменьшается, а более высокая проницаемость мембран для Ca^{2+} исключает ответы на добавку Ca^{2+} в виде экстра-расщепления АТФ. Подобный эффект достигается, например, в присутствии относительно высоких концентраций кальциевого ионофора А 23187 (см. рис. 1, В). С другой стороны, наличие функциональных ответов кальциевого насоса саркоплазматического ретикулула на добавление Ca^{2+} в пробах с T_4 (см. рис. 1, Б) и величина $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, близкая к контролю, позволяют исключить в качестве причины ингибирования транспорта Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуле прямой мембранный эффект этого гормона, аналогичный А 23187.

В связи с этим был исследован другой возможный механизм действия T_4 на аккумуляцию Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуле, заключающийся в торможении активности Ca-АТФ-азы . Как видно на рис. 2, T_4 эффективно ингибирует активность АТФ-азы саркоплазматического ретикулула, сопряженную с транспортом Ca^{2+} . В этих экспериментах фрагменты саркоплазматического ретикулула преинкубировали с гормоном в течение 5 мин, после чего начинали реакцию добавлением 5 мМ АТФ. Скорость гидролиза АТФ определяли в течение 5 мин, когда гидролазная реакция носила линейный характер. Четкое снижение активности АТФ-азы саркоплазматического ретикулула наблюдается уже в присутствии 1—5 мкМ T_4 , однако полумаксимальный эффект достигается при 15—20 мкМ гормона. В использованных препаратах саркоплазматического ретикулула кальций-зависимая активность АТФ-азы составляет около 90% от общего гидролиза АТФ, остальные 10% соответствовали так называемой магнийзависимой активности АТФ-азы. Специальными исследованиями было установлено, что этот тип гидролазной реакции практически нечувствителен к действию T_4 даже при использовании последнего в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М (на рис. 2 не показано). Полученные данные подтверждают предположение об ингибирующем действии тиреоидных гормонов на кальцийзависимую актив-

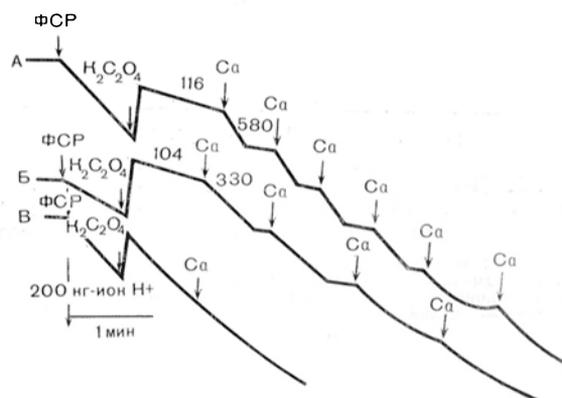


Рис. 1. Влияние $1,25 \cdot 10^{-4}$ М T_4 (Б) и $5 \cdot 10^{-6}$ М кальциевого ионофора А 23187 (В) на скорость гидролиза АТФ и время аккумуляции Ca^{2+} (200 нмоль в добавке). А — контроль. Цифры у кривых — скорость подкисления среды (в нг-ион H^+ /мин).

ность АТФ-азы, лежащем в основе торможения аккумуляции Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме.

Однако заключение о прямом действии T_4 или T_3 на каталитическую активность Са-АТФ-азы можно признать справедливым только на основании экспериментов с солиобилизованным ферментом, поскольку обще-

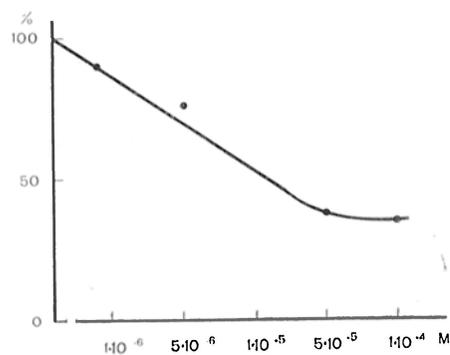


Рис. 2. Действие различных концентраций T_4 на Са-АТФ-азную активность саркоплазматического ретикулума.

Пробы объемом 1 мл содержали 75 мкг белка саркоплазматического ретикулума. По оси абсцисс — концентрация тироксина (M); по оси ординат — активность АТФ-азы (в % к контролю).

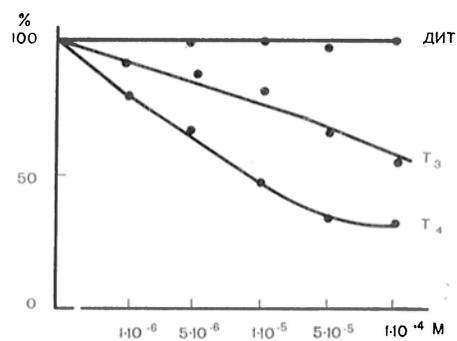


Рис. 3. Эффект различных концентраций T_4 , T_3 и дийодтирозина на активность солиобилизованной Са-АТФ-азы.

Пробы объемом 1 мл содержали 30—40 мкг белка Са-АТФ-азы, время преинкубации с йодаминокислотами 3 мин. реакцию начинали добавлением 5 мМ Mg-АТФ и через 3 мин останавливали добавлением ТХУ. Активность фермента в контроле принята за 100%. По оси абсцисс — концентрация йодаминокислот; по оси ординат — активность АТФ-азы (в %).

известно, что многие биологически активные соединения неодинаково эффективны в отношении растворимой и мембраносвязанной форм энзимов. При исследовании действия тиреоидных гормонов в различных концентрациях на солиобилизованную Са-АТФ-азу ретикулума, выделенную в высокоочищенном состоянии, было обнаружено, как и в случае мембраносвязанной АТФ-азы, ингибирование гидролиза АТФ (рис. 3) с полумаксимумом при концентрации T_4 9—10 мкМ. T_3 был менее эффективен, а в присутствии гормонально-неактивного дийодтирозина скорость АТФ-гидролазной реакции оставалась на уровне контроля.

Следует отметить, что тиреоидные гормоны модифицируют каталитическую активность многих ферментов, связывая ионы-активаторы (магний, кальций, цинк, медь и др.), изменяя реактивность SH-групп тиоловых ферментов, или иным путем [2, 3]. При исследовании солиобилизованной Са-АТФ-азы ретикулума механизм ингибирующего влияния тиреоидных гормонов в настоящее время неясен. Очевидно, из возможных механизмов можно исключить взаимодействие с сульфгидрильными группами, так как степень торможения Са-АТФ-азы в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ М T_4 практически не изменялась при добавлении двукратного избытка дитиозеритрола.

Другая возможная мишень T_4 — ионы магния, уровень которых существенно влияет на обнаружение гормональных эффектов [3]. Активность ряда ферментов, зависящих от ионов магния или меди, регулируется гормонами щитовидной железы *in vitro* неспецифически, путем образования комплексов Mg^{2+} — T_4 и снижения доступной концентрации катиона. Именно благодаря комплексованию магния T_4 ингибирует АТФ-креатинтрансфосфорилазу [3]. В АТФ-гидролазной реакции, катализируемой Са-АТФ-азой, Mg^{2+} участвует в формировании энзим-субстратного комплекса и в дефосфорилировании промежуточной формы фермента — EP [12]. Однако торможение Са-АТФ-азы вследствие связывания магния тироксином представляется маловероятным, поскольку Mg^{2+} присутствовал в среде примерно в тысячекратном избытке по отношению к гормону.

Ионы кальция регулируют процесс гидролиза АТФ Са-АТФ-азой, активируя в низких концентрациях стадию образования ЕР (K_{Ca} равно 0,35 мкМ), а в более высоких концентрациях — ингибируя распад ЕР за счет конкуренции с Mg^{2+} [12]. Накопление ЕР в присутствии избыточных концентраций Ca^{2+} выражается в торможении АТФ-азой реакции (рис. 4). Следует отметить, что инкубация солиобилизированной Са-АТФ-азы с T_4 уменьшает тормозящий эффект избыточного уровня Ca^{2+} . С другой стороны, ингибирующее действие T_4 на скорость АТФ-азной реакции в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ М Ca^{2+} вдвое слабее соответствующего эффекта при концентрации Ca^{2+} $1 \cdot 10^{-5}$ М (см. рис. 4, кривая A/A_0). Не исключено, что T_4 и избыточные количества Ca^{2+} действуют на одну и ту же стадию АТФ-азной реакции — распад ЕР, причем необязательно посредством единого механизма. Однако это предположение нуждается в прямой экспериментальной проверке.

В опытах *in vitro* T_4 также уменьшает аккумуляцию Ca^{2+} в ретикулуме, параллельно угнетается и связывание Ca^{2+} [11]. Нами установлено частичное разобщение процессов транспорта Ca^{2+} и гидролиза АТФ в саркоплазматическом ретикулуме мышц тироксинизированных конек, однако не отмечено существенных изменений в уровне Са—АТФ-азной активности саркоплазматического ретикулума подопытных животных. Однако поскольку

механизм специфического действия T_4 на кальциевый насос в условиях *in vitro* остается неясным, возможность торможения Са-АТФ-азы при повышенном уровне тиреоидных гормонов в принципе исключить нельзя. В отличие от условий, использованных нами (кальциевый буфер с большой емкостью), Аш и соавт. [11] проводили определение активности АТФ-азы в среде, содержащей в 20 раз меньше Ca^{2+} . Аккумуляция такого количества Ca^{2+} даже при наличии блока Са-АТФ-азы происходит относительно быстро, а для выявления различий в скорости гидролиза АТФ необходима регистрация процесса через короткие интервалы времени на линейном участке АТФ-азной реакции. В наших экспериментах линейная стадия реакции была продлена за счет наличия в среде кальциевого буфера высокой емкости (см. рис. 2) и, кроме того, была использована непрерывная регистрация кинетики гидролиза АТФ (см. рис. 1). Очевидно, именно эти обстоятельства позволили выявить в настоящей работе прямой эффект T_4 как на мембраносвязанную, так и на солиобилизованную форму Са-АТФ-азы.

С другой стороны, длительное введение умеренных количеств T_4 , наблюдавшееся в экспериментах Аш и соавт. [11], могло привести к изменениям в белковом и липидном составе мембран, а также к увеличению ненасыщенности жирнокислотных остатков. В результате этого модифицируется как проницаемость мембран, так и подвижность мембранных белков, осуществляющих транспортные и другие функции. В частности, установлено, что тироксин регулирует «число оборотов» митохондриального переносчика адениннуклеотидов, влияя на степень насыщенности жирных кислот [13].

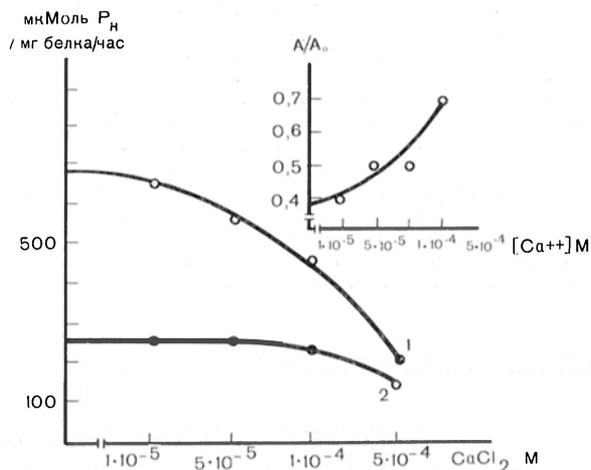


Рис. 4. Эффект T_4 на активность солиобилизированной Са-АТФ-азы в зависимости от уровня Ca^{2+} в среде. 1 — контроль; 2 — $2 \cdot 10^{-8}$ М T_4 . На вставке по оси ординат — отношение скоростей гидролиза АТФ в опыте (A) и контроле (A_0); по оси абсцисс — концентрация кальция (в М).

Зависимость активности кальциевого насоса от липидного компонента мембраны общеизвестна [14]. Очевидно, механизм гормональной регуляции подобного типа имеет не частный, а достаточно общий характер и реализуется также в условиях *in vitro* [13]. В любом случае биологические мембраны, их химические и физико-химические параметры могут рассматриваться как наиболее вероятная мишень тиреоидных гормонов. Несомненно, что именно с этой позиции может быть раскрыт механизм действия T_4 на кальциевый насос ретикулума.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ash A. S. F., Besch H. R., Narigava S. et al. — *J. Physiol. (Lond.)* 1972, v. 224, p. 1. — 2. Ноч F. — *Physiol. Rev.*, 1962, v. 42, p. 605. — 3. Гагельганс А. И., Гайдина Г. А. и др. — В кн.: Тиреоидные гормоны. Подред. Я. Х. Туракулова. Ташкент, 1972, с. 243. — 4. Мас Леппан Д. Н. — *J. biol. Chem.*, 1970, v. 245, p. 4508. — 5. Ритов В. Б. — *Биохимия*, 1971, т. 36, № 2, с. 399. — 6. Iimoto N. J. — *J. biol. Chem.*, 1975, v. 250, p. 7219. — 7. Nevilly D. M. Jr. — *Ibid.*, 1971, v. 246, p. 6328. — 8. Туракулов Я. Х., Кургульцева Л. И., Гагельганс А. И. — *Биохимия*, 1967, т. 32, с. 106. — 9. Lowry H. O., Rosebrough N. J., Fan A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265. — 10. Hasselbach W., Suko J. — *Biochem. Soc. Spec. Publ.*, 1974, № 4, p. 159. — 11. Ташмухамедов Б. А., Гагельганс А. И., Шкинев А. В. и др. — В кн.: Симпозиум «Механизм действия гормонов». Тезисы докладов. Ташкент, 1976, с. 137. — 12. Yamada S., Tomotaga Y. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1972, v. 72, p. 417. — 13. Ноч F. — *Arch. Biochem.*, 1977, v. 178, p. 535. — 14. Martonos A. — In: *Biomembranes*. Ed. L. A. Manson. London, 1971, v. 1, p. 191.

Поступила 27/1 1978 г.

ON THE EFFECT OF THYROID HORMONES ON CALCIUM PUMP IN SARCOPLASMIC RETICULUM

M. V. Zamaraeva, A. I. Gagel'gans, B. A. Tashmukhamedov

Department of Biophysics, Institute of Biochemistry, Academy of Science of the Uzbek SSR, Tashkent

In vitro thyroxine inhibited accumulation of Ca^{2+} by fragments of sarcoplasmic reticulum, isolated from rabbit skeletal muscles. The inhibitory effect of thyroxine was responsible for its direct action on Ca^{2+} dependent ATPase. Half-maximal inhibition of the enzymatic activity occurred at the same concentrations of thyroxine using both membrane-bound and highly purified solubilized forms of Ca^{2+} -ATPase (15-20 μ M and 10 μ M of the hormone, respectively). Triiodothyronine was similar in the effect but not diiodothyronine, which did not possess the hormonal activity. The data obtained suggest that thyroid hormones affect the mechanism of dephosphorylation in ATP-hydrolase reaction.

УДК 612.115.12.015.615

А. Ш. Бышевский, С. Л. Галян, Е. Л. Рудзевич

ВИТАМИН К-ЗАВИСИМЫЙ ИНГИБИТОР ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ

Кафедра биохимии Тюменского медицинского института

Активность термостабильного ингибитора тромбинообразования в сыворотке крови снижается при введении животным пелентана. Одновременное введение викасола снижает этот эффект. Снижение активности ингибитора выявляется также при частичной резекции печени и отравлении четыреххлористым углеродом. Корреляция между общей свертывающей активностью, содержанием протромбина и активностью ингибитора не выявляется. Активность ингибитора снижается при экзогенной тромбопластинемии и в меньшей степени при гипергепаринемии. На основании данных, свидетельствующих о роли витамина К в прокуции ингибитора, высказывается предположение о существовании механизма саморегуляции на уровне биосинтеза биохимических факторов свертывания крови.

Связь биосинтеза ряда коагулирующих белков с витамином К несомненна [1, 2]. Дефицит витамина К затрудняет синтез важнейших факторов протромбинового комплекса и ведет к появлению в плазме аномальных бел-

ков — предшественников протромбина, факторов VII, IX и X [3]. Установлено, в частности, что витамин К обеспечивает γ -карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в препротромбине, без чего последний не способен связывать кальций и, следовательно, превращаться в тромбин [4].

Единичные исследования взаимосвязи между различными антикоагулянтами (в частности, антифактором VII и общей антитромбопластической активностью) дали отрицательные результаты [5, 6].

Ранее мы обнаружили [7], что уровень термостабильного и особенно термостабильного ингибиторов тромбиногенеза снижается у животных, получивших пелентан. Цель настоящей работы — изучение связи между недостаточностью витамина К, вызванной введением пелентана, и активностью термостабильного ингибитора в сыворотке крови.

М е т о д и к а

Опыты проведены на 340 нелинейных белых крысах обоего пола массой от 150 до 250 г. Пелентан фирмы «Слофа» вводили в составе казеиново-крахмального рациона [8], в составе смешанного рациона, приготавливаемого в виде консистентной массы (пшеничная крупа, растительное масло, дрожжи пекарские) внутривнутрино или в желудок через зонд (взвесь в воде). Изучены дозы от 2 до 20 мг на 100 г массы в составе рациона или один раз в сутки при других путях введения. Викасол вводили в составе рациона или через зонд (4 мг на 100 г массы). Кровь брали из яремной вены. Активность термостабильного ингибитора определяли, как описано ранее [9], исключив обработку сульфатом бария, которая, как показали наши исследования [10], необязательна при определении только термостабильного ингибитора. В части опытов определяли время рекальцификации [11], протромбиновое время [12] и активность тромбопластина [13]. Экзогенную тромбопластиэмию вызывали, вводя однократно в яремную вену 1,5 мг на 100 г взвеси тромбопластина, гипергепаринэмию — однократным введением гепарина (30 ЕД на 100 г внутримышечно). Резекцию печени выполняли из срединного разреза, удаляя 50 или 70% массы органа. Отравление четыреххлористым углеродом моделировали введением последнего через зонд (0,5 мл на особь однократно в растительном масле) или ингаляционно (0,5 мл на 8 л воздуха в герметической камере, экспозиция 15 мин 1 раз в сутки с интервалом 2 дня).

Приимая во внимание вариабельность уровня ингибитора, не связанную с суточным ритмом, питанием и другими, доступными учету факторами, на каждом этапе опыта исследовали сыворотку контрольных животных, сравнивая с ней показатели в опытных группах.

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

При введении пелентана (4 мг на 100 г) в составе казеиново-крахмального рациона активность термостабильного ингибитора в сыворотке к 3-му дню снизилась с $1,16 \pm 0,08$ до $0,65 \pm 0,04$ ЕД/мл (на 43,9%), а к 7-му дню —

Т а б л и ц а 1

Активность ингибитора в сыворотке крови (в ЕД/мл) при введении пелентана в смешанном рационе (4 мг на 100 г, 5—6 крыс в группе)

Серия опытов	Время отбора проб	Контроль	Опыт	P
I	3-й день	$0,76 \pm 0,09$	$0,71 \pm 0,16$	$>0,05$
	7-й день	$1,76 \pm 0,21$	$1,14 \pm 0,12$	$<0,05$
II	3-й день	$1,24 \pm 0,16$	$1,03 \pm 0,20$	$>0,05$
	7-й день	$0,94 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,17$	$<0,05$

с $1,09 \pm 0,05$ до $0,41 \pm 0,07$ ЕД/мл (на 62,4%). При той же дозе пелентана в составе смешанного рациона (2 серии опытов с двухнедельным интервалом) активность ингибитора к 3-му дню снизилась на 6,5% в I серии и на 16,9% — во II. Снижение активности на 7-й день составило соответственно 26,2 и 33,3% (табл. 1).

В следующей серии опытов пелентан вводили в составе смешанного рациона в дозе 2 мг на 100 г. При таком способе введения наблюдалось

снижение активности ингибитора только на 12-й день (контроль $1,29 \pm 0,20$ ЕД/мл, опыт $0,89 \pm 0,10$ ЕД/мл; $P < 0,05$) и стало заметнее к 15-му дню (контроль $1,86 \pm 0,13$ ЕД/мл, опыт $1,10 \pm 0,18$ ЕД/мл; $P < 0,05$).

При внутривентральном введении пеллетана мы не получили удовлетворительных результатов: дозы 5 и 10 мг на 100 г не давали эффекта, дозы 15 и 20 мг на 100 г приводили к гибели более 50% животных без заметной гипокоагулемии при наличии значительного выпота в брюшной полости.

Т а б л и ц а 2

Активность ингибитора в сыворотке крови (в ЕД/мл) при совместном и раздельном введении пеллетана и викасола (5--7-животных в группе)

Рацион	Время отбора проб	Контроль	Пеллетан	Пеллетан + викасол	Викасол
Смешанный	4-й день <i>P</i>	$1,52 \pm 0,20$	$1,02 \pm 0,17$ $< 0,05$	$1,44 \pm 0,12$ $> 0,05$	—
	7-й день <i>P</i>	$1,24 \pm 0,23$	$0,25 \pm 0,12$ $< 0,05$	$0,61 \pm 0,14$ $< 0,05$	—
Казеиново-крахмаль- ный	4-й день <i>P</i>	$1,16 \pm 0,08$	$0,65 \pm 0,04$ $< 0,05$	$1,28 \pm 0,08$ $> 0,05$	$1,37 \pm 0,05$ $> 0,05$
	7-й день <i>P</i>	$1,09 \pm 0,05$	$0,41 \pm 0,07$ $< 0,05$	$1,07 \pm 0,11$ $> 0,05$	$1,13 \pm 0,11$ $> 0,05$

По-видимому, в связи с раздражающим влиянием на брюшину всасывание препарата затруднялось.

При введении пеллетана в желудок с помощью зонда (4 мг на 100 г) эффект обнаруживался уже на 3-й день: контроль $1,37 \pm 0,24$ ЕД/мл, опыт $0,31 \pm 0,13$ ЕД/мл ($P < 0,05$), снижение составляло 77,4%.

При одновременном введении пеллетана и викасола (по 4 мг на 100 г) в составе смешанного или казеиново-крахмального рациона (табл. 2) снижение активности ингибитора в первом случае было небольшим, а во втором не выявлялось. Введение только викасола не влияло на активность ингибитора.

Снижение активности ингибитора при введении пеллетана и способность викасола ограничивать этот эффект свидетельствуют о связи между витамином К и уровнем ингибитора. Следовало выяснить, не вторична ли эта связь, не обусловлена ли она изменением уровня протромбина, дефицит которого при К-витаминной недостаточности может сопровождаться снижением тромбинемии. В свою очередь содержание тромбина в кровотоке опосредованно определяет уровень противосвертывающих соединений [1]. В связи со сказанным мы исследовали зависимость между протромбиновым временем и временем рекальцификации, с одной стороны, и активностью ингибитора — с другой. Наряду с этим изучили активность ингибитора при экзогенной тромбопластинемии (тотчас после инъекции тромбопластина и в период гипокоагулемии, вызванной защитной реакцией на тромбопластин) и при блокаде тромбообразования гепарином. Оказалось, что у интактных животных и животных, которым вводили пеллетан (140 крыс), при группировке по значению протромбинового времени активность ингибитора не коррелирует с ним ($r = -0,12$, $P > 0,05$). Не коррелирует активность ингибитора и с временем рекальцификации, т. е. с общей свертывающей активностью ($r = -0,72$, $P > 0,05$).

Через 3 мин после введения тромбопластина в кровоток, когда время рекальцификации сокращалось, а тромбопластиновая активность увеличивалась, активность ингибитора снижалась на 67,6% (табл. 3). В период развития гипокоагулемии, когда время рекальцификации удлинилось, а тромбопластиновая активность существенно уменьшилась, активность ингибитора не отличалась от контрольных значений. При гипокоагулемии,

...овленной введением гепарина (существенное удлинение времени ре-
...цификации и снижение тромбопластиновой активности) активность
...ингибитора уменьшилась на 24,6%.

Таким образом, в момент экзогенной тромбопластинемии активность ингибитора снижается, хотя тромбинообразование в этот период кратковременно усиливается, о чем свидетельствует повышение общей свертывающей активности. Это может иметь следующее предположительное объяснение. Известно, что тканевой тромбопластин активирует фактор X, а термостабильный ингибитор, как это показано нами ранее, подавляет активность фактора Xa по типу неполного смешанного торможения. Константа образо-

Таблица 3

Активность ингибитора в сыворотке крови после введения тромбопластина или гепарина (8 крыс в группе)

Время отбора пробы	Группа животных	Время ре-кальцификации	Тромбопла-стиновая ак-тивность	Активность ингибитора, ЕД/мл
				с
3 мин после введения тромбопла-стина <i>P</i>	Контроль	118±12,1	86,2±1,3	0,97±0,07
	Опыт	82,2±0,9	112,0±2,2	0,32±0,05
1 ч после введения тромбопластина <i>P</i>	Контроль	100±6,7	89,3±4,1	0,80±0,03
	Опыт	142±12,0	39,2±1,4	0,79±0,02
30 мин после введения гепарина <i>P</i>	Контроль	128±10,2	83,2±1,4	1,22±0,08
	Опыт	212±14,1	39,2±0,8	0,92±0,08
		<0,05	<0,05	<0,05

вания комплекса ингибитор — энзим на 60% больше константы его распада [14]. Следовательно, при избытке фактора Xa концентрация свободного ингибитора должна снижаться. С этим предположением согласуются данные, свидетельствующие о нормализации активности ингибитора через 1 ч после введения тромбопластина, когда тромбопластинемия, а следовательно, и интенсивность образования фактора Xa снизилась (кратковременная гиперкоагулемия сменилась гипокоагулемией). Против непосредственной связи между уровнем протромбина и активностью ингибитора свидетельствует и некоторое снижение активности последнего при блокаде тромбиногенеза гепарином.

На основании приведенных данных можно полагать, что витамин К контролирует продукцию термостабильного ингибитора.

Синтез витамин К-зависимых прокоагулянтов осуществляется в печени [1—3]. Наиболее вероятно, что и исследуемый ингибитор продуцируется в этом же органе. В наших опытах с удалением 50 и 70% массы печени на 2-й день после резекции активность ингибитора была ниже контрольной на 61,5 и 71,9%. На 10-й день, когда вес печени восстанавливался и несколько превышал исходный, активность ингибитора оставалась ниже контрольного значения на 75,8% (при удалении 70% массы печени). При введении четыреххлористого углерода с помощью зонда уже через сутки активность ингибитора снизилась с $0,97 \pm 0,10$ до $0,68 \pm 0,18$ ЕД/мл ($P < 0,05$). При введении токсиканта ингаляционным путем на следующий день после третьей ингаляции активность ингибитора равнялась $0,50 \pm 0,10$ ЕД/мл (контроль $1,20 \pm 0,23$ ЕД/мл; $P < 0,05$). Известно, что четыреххлористый углерод вызывает гибель гепатоцитов [15, 16]. С учетом сказанного наши данные позволяют предполагать, что место синтеза ингибитора — печень, а это в свою очередь подтверждает представление о витамин К-зависимости ингибитора.

Гемостаз — система, в которой на разных уровнях выявляются механизмы саморегуляции. Так, на уровне системы в целом воздействия, веду-

щие к тромбинемии, вызывают усиленную продукцию или выход в кровь противосвертывающих соединений [1], инициатор свертывания — фактор XII — *in vivo* активизирует фибринолиз [17], расщепление фибрина и фибриногена ведет к появлению антикоагулянтов [18, 19]. Полученные нами данные позволяют выдвинуть предположение о существовании элементов саморегуляции и на уровне биосинтеза факторов свертывания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови. М., 1975. — 2. Biggs R. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis. Oxford, 1972, p. 360. — 3. Brozowicz M. — Brit. J. Haemat., 1976, v. 32, p. 9—12. — 4. Elion J., Venagous R., Labie D. — Thrombos. a. Haemostas., 1976, v. 35, p. 82—86. — 5. Данильченко Е. В. Тканевой антитромбопластин при различных экспериментальных состояниях. Автореф. дис. канд. Курск, 1973. — 6. Jürgens J. — Klin. Wschr., 1955, Bd 33, S. 143—144. — 7. Бышевский А. Ш., Рудзевич Е. Л. — Вопр. мед. химии, 1977, № 4, с. 519—525. — 8. Инструкция для приготовления основной диеты для крыс. Утверждено институтом питания АМН СССР. М., 1952. — 9. Рудзевич Е. Л., Бышевский А. Ш. — Казанск. мед. ж., 1976, № 5, с. 462—464. — 10. Рудзевич Е. Л., Галян С. Л. Способ количественного определения термостабильного ингибитора фактора Ха в сыворотке крови. Авт. свид. СССР № 141, 1978. — 11. Балуда В. П. — Лабор. дело, 1959, № 2, с. 47—55. — 12. Туголуков В. Н. — Там же, 1955, № 4, с. 17—19. — 13. Quisk A. — Am. J. med. Sci., 1947, v. 214, p. 272—277. — 14. Рудзевич Е. Л. Ингибиторы тромбинообразования сыворотки крови, свойства, механизм действия. Автореф. дис. канд. М., 1978. — 15. Вакулин Г. М., Якобсон Г. С. — Бюлл. экспер. биол., 1975, № 9, с. 103—107. — 16. Коняева А. Г., Вишневецкий Ф. Е. — Там же, 1977, № 2, с. 151—153. — 17. Jatrdis S. G., Fergusson J. H. — J. clin. Invest., 1962, v. 41, p. 1277—1281. — 18. Кудряшов Б. А., Баскова И. П., Ковалева Т. Б. — Вопр. мед. химии, 1976, № 6, с. 591—593. — 19. Тимошенко Л. И. — Лабор. дело, 1976, № 9, с. 515—520.

Поступила 27/II 1978 г.

VITAMIN K - DEPENDENT INHIBITOR OF THROMBINFORMATION

A. Sh. Byshevsky, S. L. Galyan, E. L. Rudzевич

Chair of Biochemistry, Medical School, Tyumen

Activity of thermostable inhibitor of thrombinformation was decreased in blood serum after administration of pelenthanе into animals. Simultaneous administration of vicasol limited this effect. Decrease in the activity of the inhibitor was also observed after partial hepatectomy and poisoning with CCl_4 . Correlation was not found between total coagulation activity, content of prothrombin and the inhibitor activity. The inhibitor was inactivated markedly in exogenous thromboplastinemia and lesser — in hyperheparinemia. The data obtained suggest that selfregulation of blood coagulation system occurs at the level of synthesis of its biochemical components.

УДК 616.391.04:577.161.2]-092.9

В. А. Исаева, И. А. Алексеева, Н. В. Блажевич, В. Б. Спиричев

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ВИТАМИНА D ПРИ РАЗЛИЧНОМ СООТНОШЕНИИ КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА В РАЦИОНЕ

Лаборатория биохимии и физиологии витаминов Института питания АМН СССР, Москва

Изменение соотношения кальция и фосфора в рационе растущих крыс в сторону избытка фосфора (1 : 2) усиливает такие проявления недостаточности витамина D, как гипокальцемия и задержка роста животных. Полученные данные указывают на возможную роль избыточного потребления фосфора в патогенезе рахита и необходимость уточнения оптимального соотношения кальция и фосфора в рационе детей.

Витамин D осуществляет свои функции в организме в виде 1,25-диоксикальциферола, непосредственно ответственного за усиление всасывания кальция в кишечнике, его мобилизацию из костной ткани и реабсорбцию в

почках [1, 2]. Образование этой формы витамина D строго регулируется в пределах, необходимых для поддержания гомеостаза кальция. К числу факторов, регулирующих образование 1,25-дигидроксикальциферола, относится концентрация в крови кальция и неорганического фосфата [2]. Можно предполагать, что несбалансированное поступление в организм этих минеральных компонентов способно вызывать нарушение обмена и функций витамина D, способствуя развитию рахита. Особенно опасным в этом отношении может оказаться избыточное потребление фосфора, повышение концентрации которого в крови и тканях тормозит биосинтез 1,25-дигидроксикальциферола [2].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния различного соотношения кальций : фосфор (Ca : P) в рационе на развитие недостаточности витамина D у крысят.

Создание экспериментальной недостаточности витамина D у этого вида животных представляет значительные трудности, связанные с подбором соответствующего рациона и его очисткой от витамина D, а также с выбором тестов, позволяющих наиболее адекватно оценить глубину D-авитаминоза.

В отечественной литературе для создания экспериментальной недостаточности витамина D часто используются модификации так называемого рахитогенного рациона, состоящего из муки с добавлением CaCO_3 [3, 4]. Эти рационы, разработанные для биологического определения витамина D, содержат вместо животного белка неполноценный белок растительного происхождения, лишены жирового компонента, дефицитны по фосфору и создают большой избыток кальция. С успехом используемые для определения витамина D биологическим методом [5], эти рационы мало пригодны для создания адекватной модели недостаточности витамина D. При использовании этого рациона прежде всего обнаруживаются последствия не D-авитаминоза, а неполноценного белкового питания и резкого нарушения оптимального соотношения кальция и фосфора в рационе. Указанный рацион не имеет аналогии с нарушениями питания детей первого года жизни, в диете которых избытка кальция не возникает. Развивающаяся при использовании этих рационов гиперкальцемия прямо противоположна снижению концентрации кальция в крови, которое наблюдается при рахите. Более корректная модель недостаточности витамина D может быть получена с использованием рационов на основе казеина, очищенного от витамина D, и полноценных по всем остальным показателям [6].

В настоящей работе приводятся методы очистки казеина и приготовления полноценного рациона для создания экспериментальной недостаточности витамина D, а также тестов для оценки этой недостаточности, апробированных в лаборатории биохимии и физиологии витаминов Института питания АМН СССР.

М е т о д и к а

Состав рационов, используемых для создания экспериментальной недостаточности витамина D, представлен в табл. 1. В одном из рационов соотношение Ca : P составляет 2 : 1 (0,6% Ca и 0,3% P), что является оптимальным; в другом это соотношение изменено в сторону избытка фосфора и составляет 1 : 2 (0,6% Ca и 1,2% P). В табл. 2 и 3 приведен состав смеси водорастворимых витаминов и солевой смеси, используемых при приготовлении рациона.

Отмывка казеина от витамина D включает измельчение, переосаждение, экстракцию липидов смесью хлороформ — метанол (2 : 1) и двукратное кипячение со спиртом. Целью двух первых операций является придание структуре казеина большей рыхлости, что облегчает последующую отмывку от витамина D.

Молотый казеин в количестве 600 г промывают 3—4 раза водопроводной водой путем декантирования, заливают 10—12 л воды, добавляют 40 мл конц. NH_4OH и выдерживают 4 ч при периодическом перемешивании стеклянной палочкой. Для осаждения казеина его нагревают до 30°C и добавляют при перемешивании 2 н. HCl до pH 5,0. Выпавший казеин отфильтровывают через марлю, промывают 2—3 раза водой и тщательно отжимают. Отжатый казеин заливают смесью хлороформ — метанол (2 : 1) и выдерживают в течение 1 сут при периодическом перемешивании. С этого момента все операции проводят в пер-

чатках для предупреждения попадания кальциферола с кожи рук. Через 1 сут казеин отфильтровывают на вакуум-насосе и повторяют экстракцию смесью хлороформ — метанол.

Отфильтрованный казеин заливают спиртом-ректификатом и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 3 дней. После фильтрования эту операцию повторяют с новой порцией спирта. Отфильтрованный казеин высушивают тонким слоем при 80°C при периодическом перемешивании в течение 1 $\frac{1}{2}$ —2 ч.

Определение кальция и фосфора в казеине и рационе. Содержание кальция и фосфора в различных сортах казеина сильно варьируют: кальция — от 0,2 до 3,0%, фосфора — от

Т а б л и ц а 1

Состав рационов с различным соотношением Са : Р для создания экспериментальной недостаточности витамина D (при различном содержании Са и Р в казеине)

Составная часть рациона, %	Соотношение Са:Р в рационе			
	2:1 (Са 0,6%, Р 0,3%)		1:2 (Са 0,6%, Р 1,2%)	
	содержание в казеине			
	Са 2,75% Р 1,4%	Са 0,2% Р 0,8%	Са 2,75% Р 1,4%	Са 0,2% Р 0,8%
Казеин, отмытый от витамина D	22	22	22	22
Крахмал	40	40	40	40
Глюкоза	26,5	24,3	20,9	18,7
Подсолнечное масло	6	6	6	6
Метилцеллюлоза или фильтровальная бумага	3	3	3	3
Смесь водорастворимых витаминов*	0,1	0,1	0,1	0,1
Цистин	0,2	0,2	0,2	0,2
Холинхлорид	0,2	0,2	0,2	0,2
Солевая смесь (без Са и Р)**	2	2	2	2
Калий фосфорно-кислый двузамещенный (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	—	0,47	3,4	3,8
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	—	0,31	2,2	2,6
Кальций углекислый (СаСО ₃)	—	1,4	—	1,4

* См. табл. 2.

** См. табл. 3.

0,6 до 1,8%. Для правильного составления рациона необходимо исследовать содержание кальция и фосфора в используемой партии казеина и на основе полученных данных рассчитывать необходимые добавки кальция в виде СаСО₃ и фосфора в виде эквимолярной смеси K₂HPO₄·3H₂O и NaH₂PO₄·2H₂O. Правильность составления рациона необходимо проверять путем прямого определения кальция и фосфора в приготовленном рационе. Если не учитывать содержание кальция и фосфора в казеине, возможны значительные ошибки, особенно при воспроизведении рационов, описываемых зарубежными авторами.

Для определения кальция 1 г казеина или высушенного до постоянного веса рациона сжигают в муфельной печи при 500—600°C. Зола растворяют горячей 2 н. НСl и определяют кальций комплексонометрическим титрованием ЭДТА в присутствии флюорексона [7].

Для определения фосфора 1 г казеина или рациона сжигают в 5 мл смеси конц. HNO₃ и H₂SO₄ (1 : 1) [8] и после доведения объема минерализата бидистиллированной водой до 100 мл определяют фосфор колориметрически [9].

В табл. 1 приведены добавки солей кальция и фосфора для приготовления рационов с различным содержанием их при использовании сортов казеина, в одном из которых содержание кальция и фосфора составляет соответственно 2,75 и 1,4%, а в другом — 0,2 и 0,8%. При незначительных отклонениях индивидуальных партий казеина от указанных величин этими отклонениями можно пренебречь, используя указанные в табл. 1 добавки.

Воспроизведение недостаточности витамина D. В опыте используют крысят-самцов — отъемышей с исходной массой 30—50 г. Более взрослые животные значительно менее чувствительны к недостаточности витамина D, и вызвать у них экспериментальный D-авитаминоз гораздо сложнее. Животных содержат в индивидуальных клетках и затемненном помещении для предупреждения образования витамина на шерсти под действием света. Длительность пребывания животных на искусственном рационе 30—40 дней. За это время у крысят развиваются глубокие проявления недостаточности витамина D, выражающиеся в гипокальцемии и нарушении всасывания кальция в тонком кишечнике. Контрольные животные получают тот же искусственный рацион, но с добавлением витамина D. Витамин вводят контрольным крысам зондом в виде раствора эргокальциферола в подсолнечном масле с концентрацией 240 МЕ (6 мкг) в 1 мл 3 раза в неделю по 0,2 мл, что обеспечивает

недельное потребление 72 МЕ, или около 10 МЕ на крысу в день, и соответствует физиологической потребности этого вида животных в витамине D.

Оценка обеспеченности витамином D. Для оценки обеспеченности витамином D исследуют концентрацию кальция и фосфора в сыворотке крови, определяя кальций комплексометрическим титрованием [7], а фосфор колориметрическим методом [9].

Для оценки обеспеченности экспериментальных животных витамином D и состояния контролируемых этим витамином процессов активного транспорта кальция в тонком кишеч-

Т а б л и ц а 2

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

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

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

Т а б л и ц а 3

Состав солевой смеси без Са и Р, используемой в рационе для создания недостаточности витамина D

Соль	Содержание соли в смеси, %
Калий хлористый (KCl)	57,7
Натрий хлористый (NaCl)	20,9
Магний сернокислый (MgSO ₄)	17,9
Железо сернокислое (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	3,22
Медь сернокислая (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,078
Натрий фтористый (NaF)	0,113
Кобальт хлористый (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0,004
Марганец сернокислый (MnSO ₄ ·5H ₂ O)	0,057
Цинк сернокислый (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0,44
Аммоний молибденовокислый [(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O]	0,005
Калий йодистый (KI)	0,01

нике широкое распространение получил тест на способность изолированного отрезка тонкого кишечника к всасыванию кальция против концентрационного градиента [10].

При проведении этого теста вывернутый мешочек, приготовленный из отрезка тонкого кишечника, инкубируют 1½ ч при 37°C в аэрируемой карбогенной смесью (96% O₂ — 4% CO₂) питательной среде, содержащей меченый ⁴⁵Са, заполняя мешочек средой того же состава (NaCl — 12 мМ, фруктоза — 10 мМ, трис-НСI-буфер рН 7,4—30 мМ, ⁴⁵СаCl₂ в таком количестве, чтобы 0,1 мл среды давали 1000—5000 имп/мин, СаCl₂ — до конечной концентрации с учетом ⁴⁵Са — 0,25 мМ). В ходе инкубации концентрация меченого кальция внутри мешочка возрастает за счет его всасывания по механизму активного транспорта. После инкубации просчитывают радиоактивность равных аликвот среды инкубации и содержимого мешочка на газопроточном счетчике «Протока» или другом подходящем приборе. Интенсивность активного транспорта выражают как отношение радиоактивности внутри мешочка и радиоактивности инкубационной среды (Са_в : Са_и).

Результаты и обсуждение

Для изучения влияния различного соотношения кальция и фосфора в рационе на развитие недостаточности витамина D был поставлен эксперимент на 80 крысах-отъемышах.

Животные были разделены на 4 группы и получали лишенный витамина D рацион с различным соотношением кальция и фосфора: у животных 1-й и 2-й групп оно было равно 2 : 1, 3-й и 4-й — 1 : 2 (см. табл. 1). Животные 1-й и 3-й групп получали в дополнение к общему рациону эргокальциферол и служили контролем.

На рисунке представлены данные о росте животных в процессе опыта. Недостаток витамина D в рационе не влиял на рост животных, получавших кальций и фосфор в соотношении 2 : 1, но вызывал замедление роста, если это соотношение составляло 1 : 2. К концу опыта вес крыс, находившихся

на рационе, лишенном витамина D с соотношением Ca : P 1 : 2, составляя 93 ± 5 г, контрольных — 111 ± 6 г ($p < 0,05$).

Недостаточность витамина D приводила к снижению концентрации кальция в сыворотке крови животных, получавших рацион с соотношением Ca : P 2 : 1, до $8,0 \pm 0,3$ мг на 100 мл (при норме $9,7 \pm 0,1$ мг на 100 мл), находившихся на рационе с соотношением Ca : P 1 : 2 — до $6,6 \pm 0,3$ мг на 100 мл (табл. 4).

Концентрация фосфора в сыворотке крови при недостаточности витамина D изменялась неодинаково: она снижалась у крыс, получавших кальций и фосфор в соотношении 2 : 1, и повышалась у животных, у которых это соотношение составляло 1 : 2.

У животных с недостаточностью витамина D наблюдалось значительное снижение способности тонкого кишечника к активному транспорту кальция против концентрационного градиента *in vitro* независимо от соотношения кальция и фосфора в рационе (см. табл. 4).

Полученные данные свидетельствуют, что пребывание крысят в течение 5 нед на рационе, лишенном витамина D, но полноценном по всем остальным показателям, приводит к развитию экспериментального D-авитаминоза, характеризующегося такими

Влияние различного соотношения Ca и P в рационе на рост крыс с экспериментальной недостаточностью витамина D.

Слева — соотношение Ca : P 2 : 1; справа — 1 : 2. 1, 3 — животные, получающие витамин D; 2, 4 — животные с недостаточностью витамина D.

резкое снижение зависящего от витамина D транспорта кальция в тонком кишечнике против концентрационного градиента и существенное сни-

Т а б л и ц а 4

Влияние различного соотношения Ca и P в рационе крыс на развитие некоторых проявлений недостаточности витамина D

Исследуемый показатель	Соотношение Ca:P в рационе	Группа животных	
		контрольная	с недостаточностью витамина D
Ca сыворотки, мг%			
P_1	2:1	$9,7 \pm 0,1$ (12)	$8,0 \pm 0,3$ (11) <0,001
P_1	1:2	$9,8 \pm 0,1$ (9)	$6,6 \pm 0,3$ (11) <0,001
P сыворотки, мг%			
P_2	2:1	$7,6 \pm 0,3$ (12)	$6,6 \pm 0,6$ (11) <0,05
P_2	1:2	$7,1 \pm 0,3$ (9)	$8,1 \pm 0,4$ (8) <0,05
Активный транспорт ^{45}Ca в кишечнике $[\text{Ca}]_{\text{II}} : [\text{Ca}]_{\text{H}}$			
P_1	2:1	$2,7 \pm 0,3$ (7)	$1,3 \pm 0,1$ (6) <0,001
P_1	1:2	$2,7 \pm 0,3$ (7)	$1,4 \pm 0,1$ (8) <0,001

П р и м е ч а н и е. В скобках — число животных. P_1 дано по сравнению с контролем, P_2 — по сравнению с группой животных с соотношением Ca : P 2 : 1.

жение концентрации кальция в сыворотке крови. Развитие этих нарушений полностью предотвращается при введении животным витамина D в дозах, соответствующих их физиологической потребности.

Полученные данные показывают также тесную взаимосвязь между развитием недостаточности витамина D и соотношением кальция и фосфора в рационе. Изменение этого соотношения в сторону некоторого избытка фосфора (1 : 2) усиливают проявления недостаточности витамина D, что находит свое выражение в более глубокой гипокальцемии и заметной задержке роста животных.

Усиление гипокальцемии и других проявлений недостаточности витамина D при избыточном потреблении фосфора может быть обусловлено нарушением образования 1,25-дигидроксикальциферола, синтез которого тормозится при повышении концентрации фосфора в крови [2].

С этим предположением согласуются представленные в табл. 4 данные о более высокой концентрации фосфора в сыворотке крови крыс с недостаточностью витамина D, получающих кальций и фосфор в соотношении 1 : 2, по сравнению с животными, находившимися на рационе с соотношением кальция и фосфора 2 : 1. Однако это предположение не согласуется с одинаковой степенью подавления всасывания кальция в тонком кишечнике крыс с недостаточностью витамина D независимо от соотношения кальция и фосфора в их рационе.

Известно, что оптимальные условия для всасывания кальция в кишечнике обеспечиваются при соотношении кальция и фосфора 1 : 1. Изменение этого соотношения в сторону избытка фосфора замедляет всасывание кальция [11]. В связи с этим более обоснованным представляется предположение, что усиление гипокальцемии и замедление роста животных, получающих кальций и фосфор в соотношении 1 : 2 в рационе с недостаточностью витамина D, обусловлено дополнительным нарушением всасывания кальция в кишечнике из-за неблагоприятного соотношения в нем кальция и фосфора.

Представленные в настоящей работе данные о неблагоприятном влиянии на растущий организм избыточного потребления фосфора свидетельствуют о необходимости проведения специальных исследований по уточнению оптимального соотношения кальция и фосфора в рационе детей. Напомним в этой связи, что соотношение кальция и фосфора в женском молоке составляет 2 : 1. Нормы, принятые в США, предусматривают соотношение кальция и фосфора в рационе детей первых 6 мес жизни 1,5 : 1, от 6 мес до 1 года — 1,25 : 1 и старше 1 года — 1 : 1 [12]. В нашей стране рекомендуемое соотношение кальция и фосфора в рационе детей составляет 1 : 1,5—2 [13], т. е. сдвинуто в сторону некоторого избытка фосфора.

Роль одного из факторов, способствующих частоте возникновения и тяжести течения рахита у детей и снижающих эффективность профилактического применения витамина D, играет избыточное содержание фосфора в их рационе.

Более значительное нарушение соотношения кальция и фосфора (до 1 : 3) может быть причиной гипокальцемии, нефролитиаза и кальциноза сосудов даже при нормальной обеспеченности витамином D [14—16].

Соотношение кальция и фосфора в рационе детей раннего возраста может сдвигаться в сторону избыточного содержания фосфора при замене женского молока коровьим, а также при включении в рацион большого количества мучных и крупчатых изделий, бедных кальцием и богатых фосфором, с чем может быть связано хорошо известное усиление проявлений рахита при избыточном углеводном прикорме. Заслуживает внимания изучение вопроса о влиянии соотношения кальция и фосфора в рационе кормящей матери на соотношение этих элементов в грудном молоке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Спиричев В. Б. — Казанск. мед. ж., 1976, № 5, с. 406—419. — 2. Де Лука Н. Ф. — J. Lab. clin. Med., 1976, v. 87, p. 7—26. — 3. Лепский Е. М. Экспериментальный рахит. Казань, 1931. — 4. Смиланская Р. С. — В кн.: Витамины в теории и практике. М.—Л., 1941, т. 3, вып. 1, с. 226—233. — 5. Петрова Э. А. — Фармация, 1969, № 3, с. 79. — 6. Suda T., De Luca N. F., Tanasa J. —

J. Nutr., 1970, v. 100, p. 1049. — 7. Вичев Е. П., Каракашов А. В. — Вопр. мед. химии, 1960, № 6, с. 435. — 8. Будагян Ф. Е. (ред.) Методика изучения состава естественных пищевых продуктов. М., 1949, с. 74. — 9. King E. J. — Biochem. J., 1932, v. 26, p. 292. — 10. Martin D. L., De Luca H. F. — Am. J. Physiol., 1969, v. 216, p. 1351. — 11. Fournier P., Duruis J. — J. Physiol. (Paris), 1975, v. 70, p. 479—491. — 12. Gutherson D. P. — Nutr. Dieta (Basel), 1973, v. 18, p. 65—91. — 13. Покровский А. А. Физиолого-биохимические основы разработки продуктов детского питания. М., 1972. — 14. Блажевич Н. В., Спиричев В. Б., Газдаров А. К. и др. — Урол. и нефрол., 1974, № 4, с. 11—14. — 15. Блажевич Н. В., Спиричев В. Б., Поздняков А. Л. и др. — Вопр. питания, 1974, № 5, с. 28—34. — 16. Блажевич Н. В., Спиричев В. Б., Поздняков А. Л. — Кардиология, 1975, № 6, с. 67—71.

Поступила 9/III 1978 г.

EXPERIMENTAL INSUFFICIENCY OF VITAMIN D AT VARIOUS RATIOS Ca : P IN A DIET

V. A. Isaeva, I. A. Alexeeva, N. V. Blazhevich, V. B. Spirichev

Laboratory of Biochemistry and Physiology of Vitamins, Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Excess of phosphorus (the ratio Ca : P = 1 : 2) in a diet of growing rats strengthened such manifestations of vitamin D insufficiency as hypercalcemia and inhibition of animal growth. The data obtained suggest that excess of phosphorus is apparently important for pathogenesis of rachitis and the optimal ratio Ca : P should not be ignored in child diet.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.12.018:612.453-087.4

Н. П. Гончаров, С. Чекан, А. В. Антоничев, Г. В. Каця, В. Ю. Бутнев,
Е. Дисфалузи

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ 11 СТЕРОИДОВ В МАЛОМ ОБЪЕМЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ ОБЕЗЬЯН

Лаборатория биохимии Института экспериментальной патологии и терапии АМН СССР, Сухуми, СССР, отдел по изучению репродукции человека Каролинского института, Стокгольм, Швеция

Описан радиоиммунологический метод одновременного определения гестагенов, эстрогенов, андрогенов и их предшественников в плазме периферической крови, адаптированный для павианов гамадрилов и макак резусов. Использование высокоспецифических антисывороток и хроматографического выделения каждого стероида на колонках с целитом позволило с высокой степенью надежности проводить определение 11 стероидов в 1,1 мл плазмы. Построение стандартной кривой и анализ ее линейности осуществляли в системе logit-log-координат. Метод можно использовать для определения вышеперечисленных стероидов в плазме крови человека.

Радиоиммунологические методы определения различных гормонов получили широкое распространение при изучении эндокринной системы. Высокая чувствительность, надежность и производительность методов обусловили их широкое применение. Однако в большинстве методов, предложенных для стероидов, отсутствует хроматографическое разделение гормонов, а определение одного или нескольких стероидов ограничивает информативность радиоиммунологического метода.

В настоящей работе описывается метод радиоиммунологического определения группы половых стероидных гормонов и их предшественников в 1,1 мл плазмы, разработанный для плазмы человека в отделе по изучению репродукции человека Каролинского института [1, 3]. Метод адаптирован для плазмы обезьян и отчасти модифицирован.

М е т о д и к а

Растворители. В работе использовали перегнанные изооктан (эталонный), циклогексан (чда), толуол (оч), бензол (чда), этилацетат (хч), этиловый эфир, не содержащий перекисей, пропиленгликоль («Кебо», Швеция) и этиленгликоль («Мерк», ФРГ). **Фосфатную буферную систему (ФБС)**, состоящую из 0,01 М натрий-фосфатного буфера рН 7,0 0,9% NaCl, 0,1% азида натрия и желатина, готовили на деионизированной дистиллированной воде. **Уголь** Норит А, размер частиц 4—5 мкм, многократно декантировали в дистиллированной воде до полного удаления мелкодисперсных частиц и высушивали при 100°C в течение 10—12 ч. В радиоиммунологических реакциях использовали приготовленную на ФБС 1% суспензию угля, которую готовили каждые 3 дня. Целит (Analytical Filter Aid) прокаливали в муфельной печи при 540°C, охлаждали до комнатной температуры и тщательно перемешивали с пропиленгликолем (1 : 1) или этиленгликолем (2 : 1) в течение 15 мин. **Нерадиоактивные стероиды-стандарты.** Прогестерон, 17 α -оксипрогестерон, 17 α -оксипрегненолон, 20 α -оксипрогестерон, эстрон, эстрадиол, тестостерон, андростендион, 5 α -дигидротестостерон, дегидроэпиандростерон были получены от фирмы «Steraloid». Чистоту стероидов проверяли хроматографически и определением точки плавления. При необходимости стероиды чистили перекристаллизацией. Каждый стероид разводили в абсолютном этиловом спирте в диапазоне концентраций от 20 до 800 мкг/л (запасной раствор). Запасной раствор хранили в герметически закрытых сосудах при 4°C. Аликвоты запасного раствора объемом от 50 до 100 мкл разводили в 10 мл ФБС, инкубировали в водяной бане при 30°C 10 мин и встряхивали на супермиксере 30 с. Эти растворы использовали для построения стандартных кривых. Буферные растворы стероидов готовили каждые 2 нед и хранили при 4°C. **Радиоактивные стероиды:** (1,2,6,7-³H)-прогестерон (110 Ки/ммоль); (3,7-³H)-прегненолон (25 Ки/ммоль); (7-³H)-дегидроэпиандростерон (16 Ки/ммоль); (1,2,6,7-³H)-тестостерон (110 Ки/ммоль); (2,4,6,7-³H)-эстрон (85 Ки/ммоль); (2,4,6,7-³H)-эстрадиол (100 Ки/ммоль); (1,2-³H)-андростендион (45,9 Ки/ммоль); (1,2-³H)-5 α -дигидротестостерон (49 Ки/ммоль); (1,2-³H)-20-оксипрогестерон (60 Ки/ммоль); (7-³H)-17 α -оксипрегненолон (25 Ки/ммоль); (1,2-³H)-17 α -оксипрогестерон (60 Ки/ммоль) были получены от New England Nuclear. Меченые стероиды очищали на колонках с сефадексом LH-20, используя систему растворителей толуол — метанол (85 : 15). После хроматографии каждого стероида элюат упаривали в токе азота и повторно растворяли в системе бензол — этанол (9 : 1) так, чтобы в 100 мкл содержалось 10 имп/мин (запасной раствор). Рабочие растворы меченых стероидов готовили из 50—100 мкл запасного раствора, упаривали в токе азота и добавляли 10 мл ФБС, затем инкубировали на водяной бане при 30°C 10 мин, встряхивали 30 с на супермиксере. При постановке радиоиммунологической реакции использовали аликвоты в 50 и 100 мкл, в которых содержалось 10 000 и 5000 имп/мин соответственно. Стероиды, меченные в 4 положениях, очищали ежемесячно, а в 1—2 положениях — 1 раз в 2 мес.

Антисыворотки были получены в лаборатории проф. Е. Дисфалузи. Каждую используемую антисыворотку оценивали на специфичность в перекрестных реакциях с 65 стероидами. Доказана их высокая специфичность [2, 4]. Антисыворотки использовали в следующих конечных разведениях: прогестерон — 1 : 48 000; прегненолон — 1 : 24 000; 17 α -оксипрогестерон — 1 : 210 000; 17 α -оксипрегненолон — 1 : 90 000; 20 α -оксипрогестерон — 1 : 16 000; тестостерон — 1 : 45 000; дегидроэпиандростерон — 1 : 24 000; андростендион — 1 : 15 000; эстрон — 1 : 60 000; эстрадиол — 1 : 72 000 или 1 : 360 000; 5 α -дигидротестостерон — 1 : 30 000.

Экстракция стероидов из плазмы. Для определения прогестерона, прегненолона, дегидроэпиандростерона, тестостерона, эстрона и эстрадиола использовали 0,5 мл плазмы, а для определения андростендиона, дигидротестостерона, 17 α -оксипрогестерона, 17 α -оксипрегненолона, 20 α -оксипрогестерона — 0,3 мл плазмы. Экстракцию и последующее хроматографирование проводили в 3 этапа. Вначале плазму разливали по 0,5 мл во флаконы для счета, добавляли внутренний стандарт (около 1000 имп/мин) для каждого стероида во все пробы исследуемой плазмы и экстрагировали 10 мл этилового эфира в течение 1 мин на супермиксере. Водную фазу замораживали при —40°C, эфир сливали в конические пробирки размером 110×15 мм и упаривали под азотом при 40°C. Остаток растворяли в 1 мл изооктана, встряхивали на супермиксере и сразу же наносили на колонки с целитом.

Хроматография. Стеклообразные колонки длиной 400 м и внутренним диаметром 5 мм, один конец которых был сужен, промывали изооктаном, сушили, вставляли тefлоновые фильтры и плотно заполняли смесью целит — пропиленгликоль или целит — этиленгликоль так, чтобы высота целита в колонке была 50 мм. На приготовление одной колонки необходимо около 0,5 г целита. Колонки крепили на специальных панелях по 20 штук в каждой. Хроматографию проводили под давлением азота (скорость элюции не должна превышать примерно одной капли в 2 с) в термостатированной комнате при 18—20°C. Перед нанесением проб колонки промывали 10 мл изооктана. Последовательность хроматогра-

фического фракционирования стероидов представлена на схеме. Собранные элюаты упаривали в токе азота на водяной бане при 40°C, используя специальную систему для одновременного упаривания 60 проб. В пробирки с сухими остатками добавляли 0,3 мл или 1 мл ФБС, инкубировали 5 мин на водяной бане при 60°C и встряхивали 15 с на супермиксере. Затем 1/3 или 1/2 каждой пробы помещали во флаконы для счета и определяли процент открытия стероида. Определение процента открытия по внутреннему стандарту позволило установить следующие средние величины: для прогестерона — 75, прегненолона — 73, дегидроэпиандростерона — 80, тестостерона — 75, эстрогена — 86, эстрадиола — 86, андростендиона — 66, дигидротестостерона — 68, 17 α -оксипрогестерона — 78, 17 α -оксипрегненолона — 85, 20 α -оксипрогестерона — 83.

Помещали 0,1 мл каждой исследуемой пробы и пробы стандартной кривой в пробирки размером 110x8 мм, в которых проводили радиоиммунологическую реакцию (табл. 1.)

Т а б л и ц а 1

Радиоиммунологическая реакция

Обозначения	Количество проб	ФБС, мкл	Буферный раствор стандартных и опытных проб, мкл	Антисыворотка, мкл	Меченый эН стероид, мкл	Уголь, 0,5 мл
Тотальный счет (Т)	2	—	—	100	100	—
Неспецифический фон (В)	4	200	—	—	100	+
Максимальное связывание (О)	8	100	—	100	100	+
Стандартная кривая	4 на каждую точку	—	100	100	100	+
Исследуемые пробы	Дубликаты	—	100	100	100	+

Необходимо указать, что общий объем всех компонентов реакции должен составлять 0,3 мл. При определении прогестерона и прегненолона брали по 0,2 мл исследуемых проб и проб стандартной кривой. В этом случае меченый гормон и антисыворотку добавляли по 50 мкл. После этого пробирки встряхивали на супермиксере 20 с, инкубировали 10 мин на водяной

Т а б л и ц а 2

Содержание стероидов в плазме крови обезьян, пг/мл

Стероид	Павианы, гамадрилы		Макаки резусы, самцы
	самки	самцы	
Прогестерон	1 000	—	—
Прегненолон	1 250	664	380
Дегидроэпиандростерон	11 300	6 600	11 600
Тестостерон	180	5230	5 700
Эстрон	60	57	50
Эстрадиол	65	20	34
Андростендион	1 600	648	960
5 α -Дигидротестостерон	364	2 200	1 700
17 α -Оксипрогестерон	500	340	1 200
17 α --Оксипрегненолон	7 500	6 400	2 070
20 α -Оксипрогестерон	200	270	300

бане при 60°C, а затем 30 мин при 30°C, что обеспечивало оптимальные условия для связывания стероида с антисывороткой и установления равновесия между связанной и свободной формой гормона. Затем пробы помещали в ледяную баню, в каждую пробирку добавляли по 0,5 мл 1% суспензии угля и инкубировали 10 мин, периодически встряхивая штатив с пробирками. Необходимо указать, что время добавления угля во все пробы не должно превышать 3 мин. Поэтому максимальное количество пробирок не может быть больше 150 штук. После инкубации во льду пробы центрифугировали 5 мин при 4°C и 3000 об/мин. Супернатант сливали в сосуды для счета и измеряли радиоактивность проб.

Центрифугирование проводили на центрифуге ЦЛР-1, для которой были специально сконструированы и изготовлены из органического стекла двухъярусные многогнездные приемники, позволяющие одновременно центрифугировать 148 пробирок. Это давало возмож-

ность проводить определение стероидов в 166 пробах плазмы, а 32 пробирки использовать для построения стандартной кривой.

Измерение радиоактивности. Во флаконы для счета, содержащие сульфатит, добавляли 10 мл сцинтилляционной смеси (5 г ППО и 0,5 г ПОПОП на 1 л толуола). Флаконы для счета инкубировали в водяной бане 5 мин при 60°C и встряхивали на супермиксере 5 с. Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике LS-230 фирмы «Beckman» и «Nuclear Chicago» с эффективностью счета по тритию около 57 и 55% соответ-

С х е м а

Последовательность хроматографического разделения стероидов на колонках с целитом

Ц е л и т — э т и л е н г л и к о л ь (2 : 1)

10 мл изооктана		промывка
1 мл изооктана (проба)		
8 мл изооктана	* прогестерон, прегненолон, дегидроэпиандростерон	
4 мл циклогексан — бензол (97 : 3)	тестостерон	
1 мл циклогексан — бензол (97 : 3)		промывка
3,5 мл изооктан — этилацетат (85 : 15)	эстрон	
3 мл изооктан — этилацетат (75 : 25)	эстрадиол	

Ц е л и т — п р о п и л е н г л и к о л ь (1 : 1)

10 мл изооктана		промывка
1 мл изооктана (проба)		
1,5 мл изооктана		промывка
4 мл изооктана	прогестерон	
1 мл изооктан — толуол (60 : 40)		промывка
3 мл изооктан — толуол (60 : 40)	прегненолон	
4 мл изооктан — толуол (60 : 40)	дегидроэпиандростерон	

Ц е л и т — п р о п и л е н г л и к о л ь (1 : 1)

10 мл изооктана		промывка
1 мл изооктана (проба)		
4,5 мл изооктана		промывка
4 мл изооктан — толуол (92 : 8)	андростендион	
4 мл изооктан — толуол (50 : 50)	5 α -дигидротестостерон	

Ц е л и т — э т и л е н г л и к о л ь (2 : 1)

10 мл изооктана		промывка
1 мл изооктана (проба)		
3 мл изооктана		промывка
3 мл изооктана	20 α -оксипрогестерон	
1 мл изооктан — толуол (80 : 20)		промывка
3 мл изооктан — толуол (80 : 20)	17 α -оксипрогестерон	
1 мл изооктан — толуол (80 : 20)		промывка
3 мл изооктан — этилацетат (85 : 15)	17 α -оксипрегненолон	

* Суммарная фракция упаривается в токе азота, растворяется в 1 мл изооктана и фракционируется.

ственно. Расчеты выполняли на ЭВМ «Wang» модели 700 а и 720 по специально разработанным программам, позволяющим вычислять параметры стандартной кривой в системе logit-log-координат. Для каждой стандартной кривой в этой системе рассчитывали линию, наиболее соответствующую прямой, причем ее линейность проверяли с помощью вариационного анализа. При определении неизвестного количества гормона по стандартной кривой внесли поправки на потери, рассчитанные по внутреннему стандарту [2]. Рассчитывать стандартную кривую в системе logit-log-координат и последующее определение стероидов в пробах можно и без ЭВМ, используя способ расчета, который излагается нами на конкретном примере при определении прогестерона. В опыте было найдено, что T=6227 имп/мин, B=53,25 имп/мин, O=2486 имп/мин (обозначения T, B, O см. в табл. 2). Процент связывания антисыворотки равен $\frac{2486-53,25}{6227} = 39$. Стандартная кривая для прогестерона:

	имп/мин	% связывания	
20 пг×4 пробы	1381,5	54,59	+0,185
40 пг×4 пробы	909,7	35,20	-0,611
80 пг×4 пробы	555,2	20,63	-1,343
160 пг×4 пробы	306,5	10,40	-2,155
320 пг×4 пробы	177,0	5,08	-2,926
640 пг×4 пробы	110,3	2,34	-3,751

Рассчитываем относительный процент связывания для каждой точки стандартной кривой по формуле: $\% \text{ связывания} = \frac{\text{Имп/мин пробы} - B}{\text{Имп/мин } O - B} \times 100$. Например, для 20 нг

процент связывания равен $\frac{1381,5 - 53,25}{2486 - 53,25} \times 100 = 54,59$. Затем для всех точек стандарт-

ной кривой находим процент связывания и его logit по формуле: $\text{logit} = \ln \frac{1\% \text{ связанного}}{100 - \% \text{ связанного}}$

и по таблице натуральных логарифмов или используя специальную таблицу $\text{logit} - \text{anti-logit}$ [5]. Для 20 нг $\text{logit} = \ln \frac{54,59}{100 - 54,59} = \ln 1,202 = 0,1845$.

После этого строим стандартную кривую, где по оси Y откладываем logit , а по оси X — логарифмы концентраций (см. рисунок). Затем по уравнению $\text{logit } y = a - b \log x$ находим значения b (кривая) и a (точка пересечения кривой с осью y) по следующим формулам:

$$b = \frac{\text{logit } y_2 - \text{logit } y_1}{\log x_2 - \log x_1} = \frac{0 - (1,6)}{1,37 - 2,0} = -2,54, \quad (1)$$

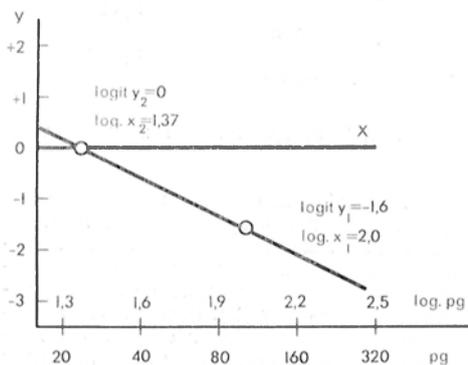
$$a = \text{logit } y_2 - b \cdot \log x_2 = 0 - (2,54) \cdot 1,37 = 3,48. \quad (2)$$

Зная значения a и b , можно быстро рассчитать содержание стероида в исследуемой пробе. Допустим, количество импульсов в минуту в пробе равно 838. Находим относительный процент связывания: $\frac{838 - 53,25}{2486 - 53,25} \times 100 = 32,5\%$, затем $\text{logit } 32,25 = -0,742$. Из

уравнения (2) следует, что $\log x = 1,662$. По таблице антилогарифмов или по стандартной кривой (см. рисунок) это соответствует 45,9 нг стероида. Затем рассчитываем абсолютное количество стероида в исследуемой пробе плазмы с поправкой на процент открытия. В данном случае в пробу перед экстракцией было внесено 923 имп/мин меченого стероида, а в $1/2$ буферного раствора пробы, взятой для определения процента открытия, найдено 310 имп/мин, т. е. с учетом фона счетчика (20 имп/мин), процент открытия составил 62,3. Истинное значение количества прогестерона в пробе составляло 73,8 нг. Так как для радиоиммунологической реакции в данном случае была взята $1/5$ часть буферного раствора пробы, то количество стероида в исследуемой пробе плазмы равнялось 369 нг.

Результаты и обсуждение

При модификации метода для определения стероидов в плазме крови самцов и самок двух видов обезьян — навианов гамадрилов и макак ре-зусов — готовили пулы плазмы (отдельно для самцов и для самок). В каж-



Стандартная кривая для прогестерона в системе logit-log -координат.

дую группу входило 15—20 животных. Критерием адекватности метода при определении того или иного стероида является тест на параллельность. Из пула плазмы отбирали три различных объема — 0,25, 0,5 и 1 мл. На каждый объем брали 4 параллельные пробы, вносили внутренний стандарт, проводили экстракцию и определение стероидов по методу, описанному выше. В случае, если logit-log -кривая, проведенная через эти 3 точки, параллельна стандартной кривой, метод можно считать адекватным. Тест на параллельность рассчитывали с помощью ЭВМ «Wang-700» по специальной программе [2]. Для всех

стероидов была получена хорошая параллельность кривых. Величина F была ниже 4,35. Исключением явился прогестерон крови самцов, для которого параллельность кривых не была доказана (величина F была значительно выше, чем 4,45). В этом случае метод не позволяет охарактеризовать истинное содержание прогестерона в плазме крови самцов обезьян и его нельзя использовать для этой цели.

Чувствительность метода при определении тестостерона, 5α -дигидротестостерона, эстрогена и эстрадиола была ниже 6,25 нг, а для прогестерона,

прегненолона, дегидроэпиандростерона, 20 α -оксипрогестерона, 17 α -оксипрегненолона, 17 α -оксипрогестерона — ниже 10 нг.

Коэффициент вариации при определении всех стероидов не превышал 10%. Водный «бланк» — экстракция ФБС эфиром и последующее определение стероидов всегда были близки к нулевым пробам, а для прегненолона они были ниже первой точки стандартной кривой. С помощью описанного метода были получены результаты, характеризующие содержание стероидов в пуле плазмы самцов и самок павианов гамадрилов и самцов макак резусов (табл. 2). Необходимо отметить, что концентрация гормонов у самок отражает базальный уровень стероидов в фолликулярную и лютеальную фазу цикла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Purvis K., Brenner P. F., Landgren B. M. et al. — Clin. Endocr., 1975, v. 4, p. 237—246. — 2. Секан З., Robertson D. M., Diczfalussy E. — Acta endocr. (Kbh.), 1973, Suppl. 177, p. 101. — 3. Brenner P. F., Guerrero R., Секан З. et al. — Steroids, 1973, v. 22, p. 775. — 4. Goncharov N., Aso T., Секан З. et al. — Acta endocr. (Kbh.), 1976, v. 82, p. 396—412. — 5. Berkson J. — J. Am. Statist. Ass., 1953, v. 48, p. 565.

Поступила 30/IX 1977 г.

A RADIOIMMUNOLOGICAL METHOD FOR ESTIMATION OF 11 STEROIDS IN SMALL SAMPLES OF MONKEY BLOOD PLASMA

N. P. Goncharov, S. Čekan, A. V. Antonichev, G. V. Katiy, B. Yu. Butnev, E. Diczfalussy

Laboratory of Biochemistry, Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of Medical Sciences of the USSR, Sukhumi, Department for Study of Human Reproduction, Carolinska Institute, Stockholm, Sweden

A radioimmunological method is described for simultaneous estimation of hestagenes, estrogenes, androgenes and their precursors in small samples of blood plasma obtained from peripheric blood of hamadryads (*Papio hamadryas*) and macaques (*Macaca rhesus*). Use of highly specific antisera and of chromatographic isolation of each steroid on columns with celite enabled to estimate the concentration of 11 steroids in 1.1 ml of blood plasma with high accuracy. Standard curve and analysis of its linearity were carried out in the coordinate system logit-log.

УДК 616.153.962.4-074

Л. А. Царюк, В. Н. Рыбачук, Л. И. Шевченко, В. М. Толстых

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФИБРИНОГЕНА ПЛАЗМЫ КРОВИ МЕТОДОМ СУЛЬФИТНОГО ОСАЖДЕНИЯ

Отдел структуры и функции белка Института биохимии АН УССР, Киев

Сравнивали два метода определения концентрации фибриногена плазмы крови — тромбиновый и сульфитный. Результаты определений фибриногена донорской плазмы тромбиновым и сульфитным методами совпадают. Если в плазме в большом количестве присутствуют продукты распада фибриногена или фибрина, тромбиновый метод дает заниженные результаты. Конечная концентрация сульфита, необходимая для осаждения фибриногена человеческой плазмы, фрагмента D не осаждает. Присутствие гепарина не влияет на определение концентрации фибриногена сульфитным методом, но может сделать неприменимым тромбиновый метод. В определенных условиях рекомендуется применение двух методов — тромбинового и сульфитного.

Существующие методы определения фибриногена основаны на разных принципах [1, 2]. Наиболее специфическим является метод, в котором фибриноген превращается в фибрин под действием тромбина. Существует несколько модификаций этого метода [3—6]. Тромбиновый метод достоверен, но в случае патологической плазмы, содержащей продукты распада фибриногена (ПРФ), результаты определения оказываются заниженными [2]. Кроме того, полное ферментативное свертывание фибриногена требует высокоочищенного препарата тромбина и продолжительного времени инку-

бации. Не удивительно, что продолжают поиски иных методов определения фибриногена [7].

Кемпбелл и Ханна применили для определения концентрации фибриногена сульфит натрия [8]. Этот метод в разных модификациях использовали и другие авторы [9—13]. Ремплинг и Гефни [12, 13] нашли, что сульфит осаждает фибриноген в виде разобщенных полипептидных цепей $A\alpha$, $B\beta$, γ , поэтому осаждение можно назвать сульфитолизным, отличным от обычного высаливания цельных молекул. Сопоставляя результаты тромбинового и сульфитного методов, эти авторы обнаружили хорошую корреляцию. Считают, что при заболеваниях, связанных с образованием ПРФ, определять концентрацию фибриногена следует параллельно двумя методами — тромбиновым и сульфитным [13]. Целесообразность такой комбинации подтверждена в работе Лейна и соавт. [2]. Сульфитный метод быстрее и проще тромбинового, но требует некоторой доработки. Это видно уже из того, что концентрации сульфита, применяемые разными авторами, существенно различаются [9—13]. Стремясь оценить сульфитный метод на основании собственного опыта, мы провели данное исследование.

М е т о д и к а

Плазму крови человека получали обычным способом, применяя в качестве антикоагулянта 3,8% цитрат натрия (1 объем на 9 объемов крови). Для предотвращения протеолиза добавляли 1 мг соевого ингибитора на 10 мл крови. Фрагмент D выделяли после гидролиза фибриногена трипсином [14]. Использовали сульфит натрия ч. д. а. ГОСТ 195-66. Тромбин получали по методу Сигерса [15]. Активность препарата определяли по методу Эренпрайза и Шераги [16] — 37,4 метиловый эфир тозил-аргининс (ТАМЭ) ед/мг препарата. Гепарин — 5000 Ед/мл.

Сульфитный метод. Нами модифицирован метод Ремплинга и Гефни [13]. 0,2 мл плазмы помещали в центрифужную пробирку и добавляли 1,8 мл 10,9% раствора сульфита натрия. Пробирку выдерживали на водяной бане при 37°C 15 мин и центрифугировали 15 мин при 2500—3000 об/мин. Надосадочную жидкость тщательно сливали, осадок промывали 2 мл 10,9% раствора сульфита натрия, центрифугировали 15 мин при 2500—3000 об/мин, надосадок сливали, осадок растворяли добавлением 5 мл 0,1 н. NaOH и нагревали 8 мин на кипящей водяной бане, тщательно перемешивая содержимое пробирки стеклянной палочкой. Определяли поглощение раствора на спектрофотометре СФ-4 при 280, 320, 330 и 340 нм в 1 см кювете, используя в качестве контрольного раствора 0,1 н. NaOH. Зная экстинкцию раствора при 320, 330 и 340 нм, экстраполяцией находили значение мутности при 280 нм. Поправка на мутность необходима. Расчет производили по формуле:

$$\frac{E_{280} - \text{мутность}_{\text{NaOH}}}{15,67} \times 25\,000 = \text{концентрации фибриногена в мг на 100 мл,}$$

где 15,67 — $E_{280}^{1\%}$ для фибриногена в щелочной среде.

Тромбиновый метод. Нами модифицирована методика Бидвела [3]. В пробирку наливали 1,65 мл фосфатного буфера pH 6,5, 0,15, 0,1 мл соевого ингибитора с концентрацией 2 мг/мл, 0,15 мл плазмы, все тщательно перемешивали, после чего добавляли 0,1 мл тромбина в концентрации 0,4 мг/мл. Тщательно перемешанную смесь оставляли на 2 ч при 37°C. Образовавшиеся сгустки собирали, накручивая на шероховатые стеклянные палочки, дважды промывали физиологическим раствором и переносили в чистые пробирки. Растворение сгустка, измерение концентрации фибриногена и расчет производили, как и при сульфитном методе, умножая вместо коэффициента 25 000 ввиду другого разбавления на коэффициент 33 333.

Для полуколичественного определения ПРФ в плазме использовали метод Т. В. Варечкой, о котором будет сообщено особо. Результаты выражали, визуально оценивая реакцию по шкале: 0; ±; 1+; 2+; 3+; 4+.

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

Мы начали работу с выявления зависимости сульфитолизного осаждения фибриногена нормальной плазмы человека от концентрации сульфита (рис. 1). Осаждение начинается при концентрации сульфита около 8%. При увеличении концентрации сульфита количество осажденного фибриногена сначала сильно возрастает, затем становится более пологим. Такая конфигурация кривой указывает на осаждение определенной белковой фракции плазмы. На рис. 1 кружком отмечена точка кривой, соответствующая коли-

честву фибриногена, определяемого тромбиновым методом (пунктирная линия). Абсцисса этой точки соответствует концентрации сульфита 9,8%. Таким образом, в условиях данного теста для сульфитолитного осаждения фибриногена, коагулируемого тромбином, требуется 9,8% сульфита. Эта величина с небольшими отклонениями найдена во всех наших опытах.

Наряду с плазмой крови человека мы исследовали плазму крови быка. Плазма быка, как известно, имеет свои видовые особенности, например высокое содержание фибриногена в норме. Несмотря на это, с плазмой быка

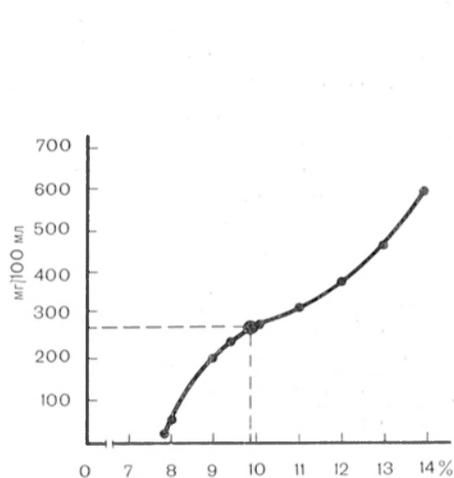


Рис. 1. Кривая осаждения белков донорской плазмы сульфитом натрия.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — конечная концентрация сульфита натрия (в %); по оси ординат — концентрация осаждаемого белка (в мг на 100 мл в пересчете на фибриноген). Пунктирная линия — концентрация фибриногена, найденная тромбиновым методом.

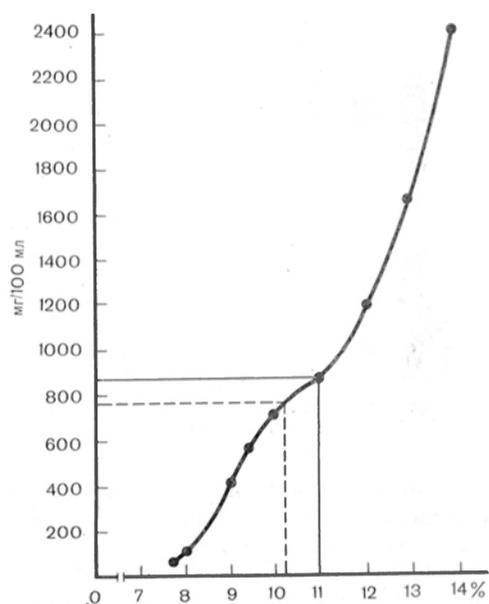


Рис. 2. Кривая осаждения белков бычьей плазмы сульфитом натрия.

были получены сходные результаты (рис. 2). Во многих случаях можно было отметить, что концентрация сульфита, достаточная для осаждения фибриногена, определяемого тромбиновым методом, ниже той, которая дает полное осаждение первой (фибриногеновой) фракции белка (см. рис. 2, сплошная линия). Напрашивалось предположение, что, кроме свертываемого

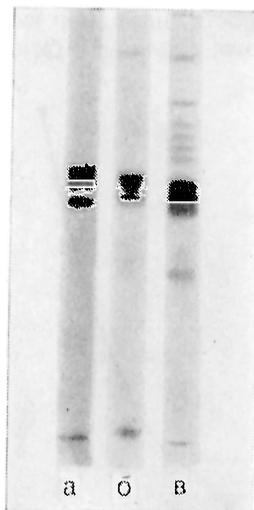
Т а б л и ц а 1

Определение фибриногена тромбиновым и сульфитным методами

Метод определения	Число образцов	Среднее значение мг на 100 мл	Пределы концентрации	Коэффициент вариации, %
Сульфитный	7	186	100—273	5

тромбином фибриногена, плазма содержит такую его разновидность, которая резистентна к свертываемости тромбином, но не к сульфитолитному осаждению. Это предположение мы проверили следующим образом. опыты проводили на плазме быка. После осаждения сульфитом фибриногена, способного свертываться тромбином, осадок был удален, а в него внесена дополнительная порция сульфита. При этом получился новый осадок, который был растворен и исследован методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [17, 18]. На электрофореграмме были видны три полосы, характерные для полипептидных цепей фибриногена

(рис. 3). Особенно четко эта картина была видна после обработки материала β -меркаптоэтанолом, обеспечивающим полный разрыв дисульфидных связей. Таким образом, наличие фибриногена в надосадочной жидкости подтвердилось. Тот факт, что количество фибриногена, осаждаемого сульфитом, зачастую больше, чем свертываемого тромбином, представляет интерес, но в данном случае важно было убедиться, что при помощи сульфита, взятого в определенной концентрации, можно определить фибриноген, свертываемый тромбином.



Мы провели определение фибриногена в 7 образцах нормальной плазмы человека, используя параллельно тромбиновый и сульфитный методы. Результаты представлены в табл. 1.

Полученные результаты свидетельствуют о хорошей корреляции тромбинового и сульфитного методов определения концентрации фибриногена донорских плазм ($r=+0,97$, $P < 0,001$) [18].

Рис. 3. Электрофорез образцов, обработанных 2% додецилсульфатом натрия, в 5% полиакриламидном геле.

а — очищенный бычий фибриноген, восстановленный β -меркаптоэтанолом; б — осадок после вторичного осаждения 11% сульфитом натрия надосадочной жидкости бычьей плазмы, обработанной 10,3% сульфитом натрия (конечные концентрации); в — то же, что и б после обработки β -меркаптоэтанолом.

Было исследовано влияние различных доз гепарина на результаты определения концентрации фибриногена в плазме тромбиновым и сульфитным методами (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют, что в условиях нашего теста, когда концентрация тромбина составляет 0,75 ТАМЭ ед/мл, гепарин в концентрации 2,5 ЕД/мл плазмы и выше мешает определению фибриногена тромбиновым методом. На определение концентрации фибриногена сульфитным методом гепарин не влияет.

Таблица 2

Влияние гепарина на определение фибриногена сульфитным и тромбиновым методами

Концентрация гепарина, ЕД на 1 мл плазмы	Тромбиновый метод	Сульфитный метод
	мг на 100 мл	
0,00	276	254
1,25	268	263
2,50	182	270
5,00	37	250

Таблица 3

Влияние фрагмента D на определение концентрации фибриногена тромбиновым и сульфитным методами

Весовое соотношение фибриноген плазмы:фрагмент	Тромбиновый метод	Сульфитный метод
	Без фрагмента (контроль)	110
1:0,15	104	135
1:0,30	77	121
1:0,45	75	126

Сравнение тромбинового и сульфитного методов определения фибриногена в плазме при наличии ПРФ мы провели с нормальной плазмой человека, содержащей фибриноген в концентрации 150 мг на 100 мл. К этой плазме прибавляли в качестве ПРФ раствор полученного из фибриногена фрагмента D в 0,15 М NaCl. В контрольные образцы вместо фрагмента D добавляли 0,15 М NaCl (табл. 3).

Полученные данные подтверждают, что фрагмент D не влияет на определение фибриногена сульфитным методом, но, присутствуя в больших количествах, вызывает занижение результатов, получаемых тромбиновым ме-

тодом. Малые количества фрагмента D неактивны, что согласуется с данными литературы [13]. Наши немногочисленные данные по определению фибриногена в плазме при патологических состояниях сульфитным и тромбиновым методами приведены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4

Определение фибриногена в плазме при некоторых заболеваниях тромбиновым и сульфитным методами

Диагноз	Активность ПРФ	Фибриноген	
		тромбиновый ме- тод	сульфитный ме- тод
		мг на 100 мл	
Гепатит	±	454	443
»	1+	434	402
Инфекционный артрит	0	429	408
Красная волчанка	0	491	522
»	3-	563	667

Можно констатировать, что и в этом случае малые количества ПРФ не оказывают влияния на определение фибриногена тромбиновым и сульфитным методами. В одном случае, когда обнаружилось большое количество ПРФ, концентрация фибриногена, определенная сульфитным методом, оказалась значительно больше; этот результат согласуется с данными Ремплинга и Гефни [13]. Наши данные подтверждают целесообразность параллельного применения тромбинового и сульфитного методов, когда есть основания сомневаться в результатах тромбинового метода. Для дальнейшего уточнения этого вопроса желательно специальное клиническое исследование.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., 1953, с. 353.
2. Lane D. A., Rampling M. W., Kakkar V. V. — Clin. chim. Acta, 1976, v. 71, p. 15—19.
3. Bidwell E. — Biochem. J., 1953, v. 55, p. 497—506.
4. Ratnoff O. D., Menzies C. — J. Lab. clin. Med., 1951, v. 37, p. 316.
5. Clauss A. — Acta haemat. (Basel), 1957, v. 17, p. 237.
6. Durr J. E., Vodrázka Z. — Thrombos. Res., 1974, v. 5, p. 213.
7. Prefontaine M. — Canad. J. med. Technol., 1977, v. 39, p. 16—20.
8. Campbell W. R., Hanna M. I. — J. biol. Chem., 1937, v. 119, p. 9—15.
9. Fierro L., Lurort D., Vega F. — Rev. Inst. Salub. Enferm. trop. (Méx.), 1948, v. 87, p. 9.
10. Goodwin J. F. — Am. J. clin. Path., 1961, v. 35, p. 227—252.
11. Goodwin J. F. — Clin. Chem., 1965, v. 11, p. 63.
12. Rampling M. W. — Biochem. J., 1974, v. 143, p. 767.
13. Rampling M. W., Gaffney P. J. — Clin. chim. Acta, 1976, v. 67, p. 43—52.
14. Белицер В. А., Варецкая Т. В., Цинкаловская С. Л. и др. — Укр. биохим. ж., 1972, т. 44, с. 411.
15. Seegers W. H., Alkjaersig N. — Arch. Biochem., 1956, v. 61, p. 1—19.
16. Ehrenpreis S., Sheraga H. A. — J. biol. Chem., 1957, v. 227, p. 1043—1061.
17. Weber K., Osborn M. — Ibid., 1969, v. 244, p. 4406.
18. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. — Biochemistry (Wash.), 1971, v. 10, p. 2606.
19. Лейдлер К. Кистица органических реакций, м., 1966, с. 34—344.

Поступила 27/11 1978 г.

ESTIMATION OF FIBRINOGEN CONCENTRATION IN BLOOD PLASMA BY SULFITE PRECIPITATION

L. A. Tsaryuk, V. N. Rybachuk, L. I. Shevchenko, V. M. Tolstykh

Department of Protein Structure and Function, Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Two methods using thrombine and sulfite were compared for estimation of fibrinogen concentration in blood plasma. Both methods produced the same results in estimation of fibrinogen in donor blood plasma. If blood plasma contained high amount of products of fibrinogen and/or fibrin degradation, the efficiency of thrombin method was decreased; on the other hand, final concentration of sulfite did not precipitate fragment D of fibrinogen from human blood plasma. Presence of heparin did not influence on the sulfite method but the polysaccharide might interfere in the thrombin method. Some experiments require to use both these methods for evaluation of fibrinogen in blood plasma.

Л. Б. Филиппова, А. Я. Розанов

МИКРОМЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ МЕЧЕНОГО 4-МЕТИЛ-5β-ОКСИЭТИЛТИАЗОЛА

Кафедра биохимии Одесского университета им. И. И. Мечникова

Разработан микрометод получения и очистки 4-метил-5β-оксиэтилтиазола-³⁵S путем сульфитного разложения ³⁵S-тиамина, экстракции эфиром основного продукта, отделения его от остатков пиримидинового компонента и других реагентов электрофорезом и элюирования меченого 4-метил-5β-оксиэтилтиазола с фореграмм.

Основной, не обладающий витаминной активностью продукт распада тиамин в животном организме — 4-метил-5β-оксиэтилтиазол (геминейрин) — известен также и как нейротропный фармакоагент, перспективный при лечении delirium tremens [1—3]. Однако в медицинской практике этот препарат не применяется, так как недостаточно изучен характер его действия на организм, фармакокинетика и фармакодинамика. Для выяснения этих вопросов очень удобен меченый геминейрин. Поскольку такой препарат промышленностью не производится, нашей целью было разработать условия получения и очистки 4-метил-5β-оксиэтилтиазола-³⁵S из коммерческого ³⁵S-тиамина.

Исходным методом для нашей работы послужил метод сульфитного разложения тиамин, предложенный Вильямсом [4]. Однако он применим только для больших количеств тиамин (1 г и больше), что является неприемлемым при работе с меченым тиамин. Метод Вильямса был модифицирован нами применительно к микроколичествам исходного ³⁵S-тиамина (20—100 мкг) и полученный меченый геминейрин использован в экспериментах на животных без предварительной очистки от токсипиримидинового компонента [5].

Основная задача настоящей работы состояла в получении микроколичеств хроматографически чистого 4-метил-5β-оксиэтилтиазола-³⁵S.

М е т о д и к а

³⁵S-тиамин в количестве 30—100 мкг растворяли в 0,5 мл реакционной смеси, содержащей 2,6 М Na₂SO₃ и 0,5 М H₂SO₄ (рН 4,8÷5,0) и выдерживали в защищенном от света месте при комнатной температуре в течение 48 ч. В предварительных опытах хроматографически и флюориметрически было показано, что через 48 ч разложение заканчивается и реакционная смесь уже не содержит тиамин.

При разработке метода получения чистого ³⁵S-геминейрина нами были проведены две серии опытов по его электрофоретической очистке из реакционной смеси после окончания разложения.

В I серии опытов реакционную смесь наносили на полоски хроматографической бумаги № 4 Ленинградской бумажной фабрики длиной 300 мм и шириной 40 мм и подвергали электрофорезу в течение 3÷12 ч (напряжение 6,7 В/см, сила тока 0,66 мА/см). Буфером служила 0,1 М муравьиная кислота рН 2,6, ранее апробованная нами для форетической очистки производных тиамин [6, 7]. В качестве контроля использовали ³⁵S-тиамин.

Во II серии опытов из реакционной смеси после окончания сульфитного разложения предварительно экстрагировали меченый геминейрин, для чего отбирали пробы, соответствующие 40—50 мкг исходного витамина, доводили объем до 1 мл дистиллированной водой и экстрагировали основной продукт (геминейрин) 1 мл эфира, хлороформа или изобутанола в течение 4 мин. Операцию повторяли 5 раз, экстракты объединяли, иривали до объема 0,3÷0,4 мл и очищали электрофоретически, как описано выше.

Фореграммы высушивали при комнатной температуре и определяли положение радиоактивных продуктов под торцовыми счетчиком БФЛ. Меченые соединения из активных пятен элюировали холодной бидистиллированной водой в темном прохладном месте в течение 3—5 ч, после чего проверяли их гомогенность радиохроматографически в смесях Силипранди [8], ШПоля [9], как описано ранее [10, 11].

Результаты и обсуждение

За 3 ч электрофореза исходный ^{35}S -тиамин разделяется на 5 радиоактивных компонентов, 4 из которых были идентифицированы нами ранее [12]. Это анион сульфита и катионы: тиаминдисульфид (подвижность 5—10 мм), тиохром (подвижность 55—75 мм) и тиамин (подвижность 95—105 мм), содержание которых составляет 1,7, 2,5, 2,0 и 92 % соответственно. Содержание неидентифицированного компонента (подвижность 40—43 мм) составляло 1,8 % от общей радиоактивности препарата. Такой результат свидетельствует о незначительном содержании радиоактивных примесей в коммерческих препаратах ^{35}S -тиамина. Количество примесей зависит от длительности предшествующего хранения и исходного препарата [12].

Радиохроматографический контроль в смеси Силипранди элюата с активного пятна фореграммы, соответствующего ^{35}S -тиамину, показал, что после электрофореза меченый тиамин не содержит радиоактивных примесей, что свидетельствует о надежности метода электрофоретической очистки ^{35}S -тиамина.

В отличие от исходного ^{35}S -тиамина, продукты его сульфитного разложения разделяются медленнее при тех же условиях электрофореза. Так, после 3 ч разделения в месте нанесения реакционной смеси, содержащей продукты разложения ^{35}S -тиамина, на форетической ленте регистрируется один пик радиоактивности.

При контрольной хроматографии элюата этой зоны фореграммы в смеси Силипранди обнаруживается 2 радиоактивных компонента, а при хроматографии исходной реакционной смеси, не подвергавшейся электрофорезу, — 3. Увеличивая время электрофореза (6, 9, 12 ч), удалось добиться разделения продуктов сульфитного разложения тиамина на 2 радиоактивных компонента: у места нанесения слабоподвижный анион и количественно преобладающий катион (рис. 1). При этом «аниону» соответствовала желтоватая линия на фореграмме, слабо флюоресцирующая сине-фиолетовым светом в УФ-свете, а «катиону» — невидимая в рассеянном дневном свете, но сильно поглощающая УФ-лучи с длиной волны 265 нм и хорошо заметная в этих условиях в виде темной поперечной полосы. Идентификация этих двух продуктов реакции проводилась двумя способами.

В первом варианте радиоактивные компоненты элюировали с фореграмм и подвергали хроматографии (см. рис. 1). Компонент с R_f 0,78—0,87 (смесь Силипранди) был идентифицирован как тиохром (ТХ) на основании предшествующих исследований [5]. Количественно преобладающий компонент с R_f 0,95—0,98 был идентифицирован как 4-метил-5β-оксиэтилтиазол (ТЗ) по чистому свидетелю и поглощению све-

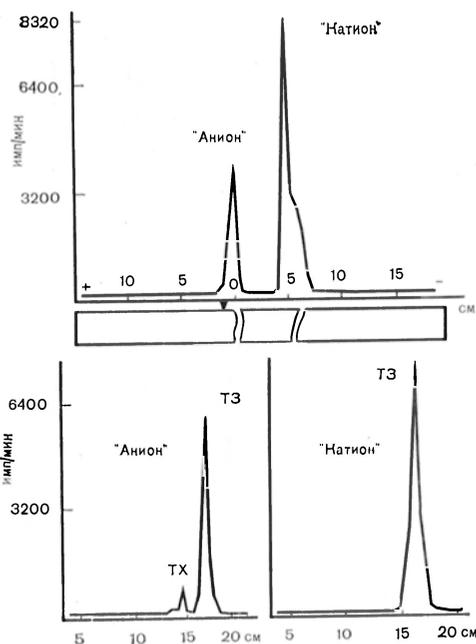


Рис. 1. Радиоэлектрофорез продуктов сульфитного разложения ^{35}S -тиамина в течение 9 ч в 1 М муравьиной кислоте (под графиком вид форетической ленты в УФ-свете). Радиохроматографический контроль элюатов «аниона» и «катиона», смесь Силипранди.

$$R_{f_{\text{ТХ}}} = 0,78-0,87, \quad R_{f_{\text{ТЗ}}} = 0,95-0,98.$$

та с длиной волны 249—252 нм, что соответствует данным литературы для ТЗ [13].

В специальных исследованиях мы попытались выяснить, не образует ли геминейрин комплексы с формиатом и компонентами реак-

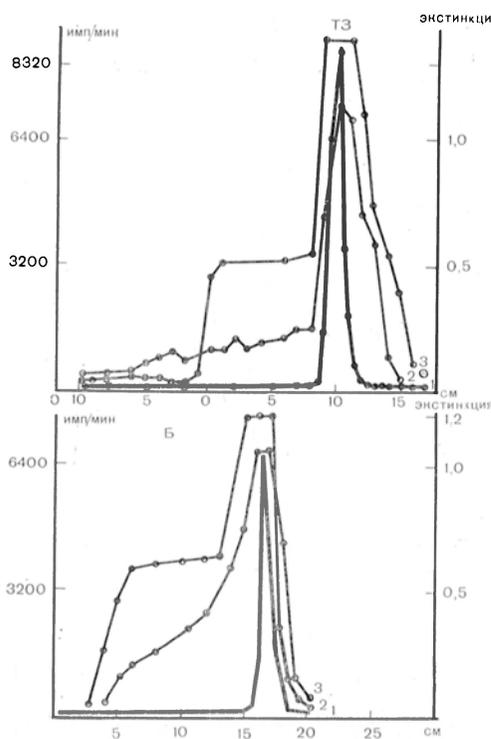


Рис. 2. Радиоэлектрофорез эфирных экстрактов продуктов сульфитного разложения ^{35}S -тиамина в течение 3 ч и в 1 М муравьиной кислоте (А), радиохроматографический контроль 4-метил-5 β -оксиэтилтиазола- ^{35}S , элюированного с фореграммы (Б). $R_f=0,94-0,98$. Поглощение света с длиной волны 250 нм.

1 — радиоактивность на ленте; 2 — поглощение света элюатами соответствующих участков ленты; 3 — поглощение света чистым 4-метил-5- β -оксиэтилтиазолом.

плекса ТЗ с формиатом натрия замедляет его продвижение к отрицательному полюсу.

Таким образом, с помощью электрофореза на бумаге нам удалось получить радиохроматографически, но не химически чистый геминейрин.

Во втором варианте опытов производили предварительную экстракцию меченого 4-метил-5 β -оксиэтилтиазола из продуктов сульфитного разложения ^{35}S -тиамина эфиром, хлороформом и изобутанолом с последующим электрофоретическим разделением экстрактов. В предварительных опытах обнаружилось, что хлороформ экстрагирует 10% основного продукта, изобутанол — около 60%, а диэтиловый эфир — более 80%, причем в последнем случае экстракция происходит лучше из кислых растворов, чем из щелочных (соответственно 80—87 и 71—76%).

После 3 ч электрофореза объединенных и упаренных эфирных экстрактов на фореграмме регистрируется один радиоактивный компонент (ТЗ) с подвижностью к катоду на 100 — 130 мм (рис. 2, А, 1). В УФ-свете ни до, ни после обработки фореграммы щелочным раствором феррициани-

фореза. Для этого на форетические ленты наносили реакцию смесь для сульфитного разложения витамина В₁, к которой добавляли тиамин за 48 ч до нанесения, такую же реакцию смесь, не содержащую тиамин, отдельные компоненты реакционной смеси (Na_2SO_3 , H_2SO_4) и отдельно 2,5 М муравьинокислый натрий. Электрофорез проводили, как описано выше. При наблюдении в УФ-свете на лентах, на которые наносили реакцию смесь (с тиаминем и без него) и CH_3COONa , была хорошо видна темная полоса, поглощающая УФ-лучи. При нанесении на ленту реакционной смеси, предварительно инкубированной с тиаминем, эта полоса подвигалась к катоду на 40—60 мм, в то время как при нанесении реакционной смеси без тиаминя или только муравьинокислого натрия — всего на 5—15 мм. Учитывая, что чистый тиазол в описанных условиях электрофореза «уходил» к катоду на 100 — 130 мм, о чем будет сказано ниже, можно предположить, что ТЗ в хроматографических опытах представляет собой 4-метил-5 β -оксиэтилтиазол, связанный с муравьинокислым натрием, образовавшимся в результате взаимодействия Na_2SO_3 реакционной смеси с муравьиной кислотой. Наличие ком-

да это соединение не проявляется. Хроматографический контроль в смесях Силипранди (рис. 2, Б, 1) и Шюля показал гомогенность полученного препарата. Для его идентификации как ^{35}S -геминейрина были проведены специальные исследования. В качестве свидетеля использовался чистый немеченый 4-метил-5 β -оксиэтилтиазол, который подвергали электрофорезу и хроматографии параллельно с эфирными экстрактами в тех же условиях. По данным литературы, это соединение поглощает лучи с длиной волны 252 нм [13]. В наших опытах максимум поглощения для геминейрина находился в пределах 249—252 нм (рис. 3). По окончании электрофореза и хроматографии ленты высушивали, разрезали на участки длиной 1 см, с которых проводили элюирование фосфатным буфером рН 6,0. Затем определяли поглощение элюатами лучей с длиной волны 249—252 нм на СФ-4А (см. рис. 2). Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что продукт, экстрагируемый эфиром и имеющий электрофоретическую подвижность 100—130 мм, R_f в смеси Силипранди — 0,95—0,98, в смеси Шюля — 0,95—0,97 является ^{35}S -геминейрином. При взаимодействии элюатов с различными участками фореграмм с BaCl_2 и $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ выяснилось, что полученный препарат не содержит ионов SO_3^{2-} . Выход ^{35}S -геминейрина

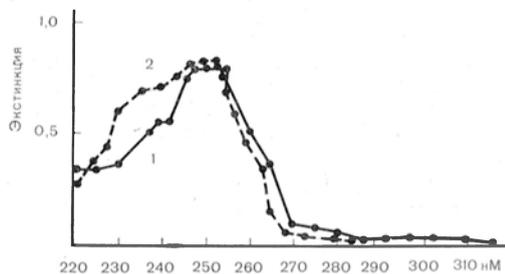


Рис. 3. Спектральные характеристики чистого немеченого 4-метил-5 β -оксиэтилтиазола (1) и элюата с активного пятна электрофореза после электрофореза эфирных экстрактов (2).

Распределение меченой серы после экстракции эфиром и электрофоретической очистки меченого геминейрина из продуктов сульфитного разложения ^{35}S -тиамина (% по отношению к исходному ^{35}S -тиамину и импульсы в минуту)

№ опыта	Исходная реакционная смесь, имп/мин	Эфирные экстракты		Электрофорез эфирных экстрактов	
		имп/мин	%	имп/мин	%
1	12 960	11 658	90,0	8 854	76,5
2	8 031	6 181	77,2	4 983	63,2
3	9 275	7 790	84,8	6 576	73,5
4	12 445	11 200	89,8	10 920	74,8
5	12 310	10 710	87,3	8 843	72,4
6	9 500	7 959	84,0	7 042	74,4
Среднее ...			85,2		71,5

после экстракции эфиром и электрофореза составляет в среднем 72% (см. таблицу).

Таким образом, путем сульфитного разложения ^{35}S -тиамина, повторных экстракций эфиром основного меченого продукта, электрофоретического разделения объединенных эфирных экстрактов в 0,1 М муравьиной кислоте в течение 3 ч и последующего элюирования водой можно получить микроколичества хроматографически и химически чистого 4-метил-5 β -оксиэтилтиазола- ^{35}S , достаточные для изучения его фармакокинетики и обмена на мелких лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Le vendel L., Kozma D. — *Argv. Hetil.*, 1967, v. 108, p. 887—889. —
2. Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты. Под ред. Ю. М. Островского. Минск, 1974, с. 63—69. —
3. Лабори А. Регуляция обменных процессов. М., 1972. —
4. Williams R. R., Waterman R. E., Keresztesy S. C. et al. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1935, v. 57, p. 536. —
5. Розанов А. Я. Метаболизм тиаминна, его фосфорных эфиров и дисульфидов в животном организме. Дис. докт. Одесса, 1960. —
6. Розанов А. Я. — *Биохимия*, 1962, т. 27, с. 641. —
7. Розанов А. Я. — Там же, 1960, т. 25, с. 233. —
8. Silirgandi O., Silirgandi N. — *Biochim. biophys. Acta*, 1954, v. 14, p. 52. —
9. Шноль С. Э. — *Бюлл. exper. биол.*, 1955, № 5, с. 72. —
10. Розанов А. Я. — *Вопр. мед. химии*, 1960, № 6, с. 208. —
11. Розанов А. Я. — *Биохимия*, 1959, т. 24, с. 267. —
12. Розанов А. Я. — *Вопр. мед. химии*, 1963, № 9, с. 294. —
13. Tomlinson R. V., Torrence P. F., Tiesckelmann H. — *Meth. Enzymol.*, 1970, v. 18, Pt A, p. 191.

Поступила 27/IX 1977 г.

THE MICROMETHOD FOR PRODUCTION AND PURIFICATION OF LABELLED 4-METHYL-5 β -HYDROXYETHYL THIAZOLE

L. B. Filippova, L. Ya. Rozanov

Chair of Biochemistry, I. I. Mechnikov State University, Odessa

A micromethod is developed for production and purification of small amounts (50-60 μ g) of 35 S-4-methyl-5 β -hydroxyethyl thiazole(hemineurine) — a neurotropic agent, which is promising for treatment of delirium tremens. 35 S-hemineurine was obtained as follows: sulfite decomposition of commercially available 35 S-thiamin, extraction of hemineurine with ether, separation of it from pyrimidine residues and other reagents by paper electrophoresis and the subsequent elution of labelled 4-methyl-5 β -hydroxyethyl thiazole from electrophoregrams. The purity of the preparation obtained was controlled by chromatographic, chemical and spectrophotometric analysis (using pure unlabelled preparation).

СИМПОЗИУМЫ ПО ТКАНЕВЫМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМ ФЕРМЕНТАМ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ И ПО БИОХИМИЧЕСКИМ ОСНОВАМ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С НАРУШЕНИЕМ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ

В конце 1977 г. в Москве состоялись два симпозиума, организованных Институтом биологической и медицинской химии АМН СССР совместно с научным советом по проблемам биологической и медицинской химии АМН СССР и Министерства здравоохранения СССР, — «Тканевые протеолитические ферменты в норме и патологии» и «Биохимические основы наследственных заболеваний, связанных с нарушением обмена углеводов (моносахаридов, полисахаридов и гликокопьюгатов)». В работе симпозиумов приняли участие около 500 биохимиков и клиницистов из Москвы и ряда других городов Советского Союза.

Задачи симпозиума, посвященного тканевым протеиназам, были сформулированы во вступительном слове акад. АМН СССР В. Н. Ореховича. В последние годы стало очевидным, что протеолитические ферменты выполняют в организме не только деструктивную функцию, но и играют важную регуляторную роль. В осуществлении регуляторной функции протеиназ решающее значение имеют реакции ограниченного протеолиза, которые могут служить пусковыми механизмами ряда физиологических процессов, таких, как свертываемость крови, фибринолиз, образование кининов, активация системы комплемента.

Протеолитические ферменты, в частности тканевые протеиназы, принимают участие в таких сложных биологических процессах, как деление и рост клеток, злокачественная и вирусная трансформация, реакции иммунного ответа организма, в развитии ряда патологических состояний — ревматоидный артрит, эмфизема легких, аллергический нефрит и др. В большинстве случаев непосредственные механизмы участия протеолитических ферментов в этих процессах остаются невыясненными. Одной из главных задач в настоящее время является выяснение физиологических функций протеолитических ферментов и вопросов, связанных с регуляцией активности этих ферментов в норме и при патологии.

В докладе В. К. Антонова «Механизм действия протеолитических ферментов» были приведены сравнительные данные по механизму гидролиза пептидной связи химотрипсином и пепсином, важнейшими представителями двух групп протеиназ — «оловых» протеиназ (сериновые и тиоловые) и карбоксильных протеиназ (кислые и металлзависимые). Рассмотрены важнейшие типы взаимодействий между группами субстрата и фермента, характеризующие продуктивный фермент-субстратный комплекс. Проанализированы роль «вторичной специфичности» пепсина в катализе, а также причины существенных различий пепсина и химотрипсина в отношении способности катализировать гидролизных, чем амидная, связей в производных карбоновых кислот. Предложены эмпирические корреляционные зависимости, связывающие структуру субстратов и их способность к гидролизу при действии химотрипсина и пепсина. Важнейшим отличием в механизме действия обоих ферментов является характер первичной атаки групп фермента на расщепляемую группу субстрата. При действии «оловых» протеиназ происходит нуклеофильная атака ионизированной гидроксильной (или тиоловой) группой активного центра на карбонильную группу расщепляемой амидной связи субстрата. Ионизация каталитически активной группы фермента обеспечивается так называемой релейной системой переноса заряда. При действии пепсина каталитически активная карбоксильная группа активного центра играет роль общего основного катализатора, отщепляя протон от молекулы воды. Последняя в этом случае выступает в качестве нуклеофильного реагента, атакующего карбонильную группу амидной связи. В докладе рассмотрены проблемы конформационных изменений химотрипсина и пепсина в ходе катализа, а также причины наблюдаемой рН-зависимости каталитических констант для этих двух ферментов. Приведенные данные сопоставлены с результатами рентгеноструктурного исследования химотрипсина и пепсина.

Л. М. Гинодманом был сделан доклад «Методы выделения протеолитических ферментов и их характеристика». Докладчик остановился на основных методах, используемых для очистки белков, таких, как фракционирование на основе различной растворимости, фракционирование на молекулярных ситах и целлюлозных ионообменниках, электрофоретическое разделение при постоянном рН, изоэлектрическое фокусирование в градиенте рН и аффинная хроматография. Последовательное применение этих методов позволяет получить высокоочищенные ферменты.

В докладе В. В. Мосолова приведены данные о природных ингибиторах протеиназ, которые представлены большой группой веществ белковой природы и встречаются в тканях животных, у высших растений и микроорганизмов. Известны ингибиторы, действующие на сериновые, тиоловые и кислые, а также металлсодержащие

протеиназы и пептидазы. В докладе обсужден механизм действия ингибиторов на сериновые протеиназы. Приведены данные о важной роли ингибиторов протеиназ в таких сложных биологических процессах, как свертываемость крови, фибринолиз, оплодотворение. Предполагается, что ингибиторы протеиназ могут играть существенную роль в защите животных и растений от патогенных микроорганизмов. Особый интерес представляет изучение возможных регуляторных функций ингибиторов в организме. Наследственная недостаточность некоторых ингибиторов протеиназ у человека приводит к тяжелым нарушениям — эмфиземе легких, тромбозам, болезням и др.

Доклад Н. И. Соловьевой был посвящен роли тканевых протеиназ в деградации соединительной ткани. Деструкция соединительной ткани в организме происходит в норме и при ряде заболеваний — ревматоидном артрите, аллергическом нефрите, эмфиземе легких и др. Этот процесс сопровождается локальным выбросом тканевых протеолитических ферментов, которые ответственны за деструкцию основных компонентов соединительной ткани — протеогликанов, коллагена и эластина. При ряде патологических состояний распад соединительной ткани начинается с деструкции протеогликанов. В деструкции белковой части протеогликанов могут принимать участие катепсины B₁, D, E, G, F, нейтральные протеиназы и эластаза. Молекула второго компонента соединительной ткани — коллагена — удивительно устойчива к действию протеиназ. Показано, что при определенных условиях в тканях животных и человека появляется активная тканевая коллагеназа, которая специфически гидролизует молекулу коллагена. Продукты коллагенолитического расщепления могут подвергаться действию различных тканевых протеиназ и пептидаз. Катепсин B₁ и коллагенолитический катепсин действуют в основном на коллаген фибрилл при рН 3,5—4,0. Тканевая эластаза играет существенную роль в деструкции коллагена. Третий компонент соединительной ткани — эластин — гидролизуется эластазой, катепсином G и нейтральной протеиназой, связанной со структурой молекулы субстрата. Приведены данные, указывающие на «двухступенчатую» деградацию макромолекул соединительнотканых компонентов: внеклеточную (при участии в основном нейтральных протеиназ) и внутриклеточную — фагоцитоз (при участии в основном кислых протеиназ).

Доклад О. В. Казаковой «Свойства и биологическая роль катепсина D» был посвящен высокоактивной лизосомальной протеиназе карбоксильного типа, которая выполняет важные функции в целом ряде физиологических и патологических процессов. Катепсин D участвует в превращении внутриклеточных белков, процессах деления клеток и регенерации тканей и др. Показана важная роль этого фермента при аутоиммунных заболеваниях, злокачественном росте, в накоплении асцитной жидкости и др. В докладе приведены результаты собственных экспериментальных исследований по сравнительному исследованию катепсинов D из нормальной печени и перевиваемой саркомы крыс, изучению углеводного компонента катепсина D и его кристаллизации, которая была осуществлена автором впервые.

В докладе М. И. Левянт и В. С. Былинкиной представлены экспериментальные доказательства присутствия нейтральной протеиназы на высокоочищенных полирибосомах из печени крыс. Впервые показано существование протеиназ на полирибосомах эукариотов. Установлено, что протеиназа прочно связана с малой субъединицей полирибосом, фермент относится к типу сериновых протеиназ и является металлзависимым ферментом, обладает широкой субстратной специфичностью. Полученные данные подтверждены американскими исследователями.

В докладе Л. А. Локшиной «Ограниченный протеолиз как механизм биологической регуляции» дан обзор литературы по одному из механизмов пострибосомальной модификации белков, который осуществляется реакциями ограниченного протеолиза. В результате происходит не только образование, но также и инактивация, и модификация биологически активных белков и пептидов.

Отличительной особенностью реакций гидролиза пептидных связей является их «односторонний» характер, так как в физиологических условиях они необратимы. Это приводит к тому, что включение протеиназ в обмен может служить пусковым механизмом ряда физиологических процессов, таких, как свертываемость крови, фибринолиз, образование кининов и др. С реакциями ограниченного протеолиза связаны также морфогенетические процессы, как образование коллагеновых волокон, формирование головки фагов, процессы «созревания вирусов». Высказывается предположение о возможной индукторной роли протеиназ в таких сложных биологических процессах, как деление и рост клетки, клеточная дифференциация, морфогенез и метаморфоз. Воздействуя на энзиматические системы клетки и изменяя свойства отдельных ферментов, протеиназы могут вызывать не только количественные, но и качественные изменения обмена и играть тем самым роль «переключающих» или «выключающих» механизмов. Помимо участия в регуляции внутриклеточного метаболизма на молекулярном уровне, протеиназы осуществляют регуляцию в организме на более высоком уровне. Участвуя в биогенезе гормонов и биологически активных пептидов, протеолитические ферменты опосредованно включены в осуществление гормональной регуляции и регуляции ряда физиологических функций. В докладе обсуждается сложная система контроля активности этих ферментов в организме. Представленные данные позволяют рассматривать ограниченный протеолиз как уникальный механизм

биологической регуляции, обеспечивающий быструю реализацию физиологических процессов и их протекание в определенном «пространстве» и «времени».

В докладе Ю. Е. Е л и с е в о й «Протеолитические ферменты в регуляции кровяного давления» была рассмотрена роль протениаз ренин-ангиотензиновой и кининовой систем в регуляции кровяного давления и приведены экспериментальные данные автора. Ренин-ангиотензиновая система принимает участие в поддержании кровяного давления, в особенности в условиях сниженного объема крови и уменьшения содержания натрия в организме. Она выполняет компенсаторную роль в поддержании кровяного давления и при ряде патологических состояний, сопровождающихся снижением сердечной деятельности, а также играет существенную роль в ряде патологических процессов, сопровождающихся повышением артериального давления. Приводится схема образования физиологически активных пептидов — ангиотензина II и кининов. Автором совместно с В. Н. Ореховичем был обнаружен и получен в высокоочищенном состоянии протеолитический фермент — карбоксикапепсин (пептидилдипептидаза, КФ 3.4.15.1), изучены его свойства и специфичность действия. Показано, что он превращает ангиотензин I в ангиотензин II и разрушает брадикинин. Эти реакции осуществляются путем отщепления ферментом С-концевого дипептида от соответствующего субстрата. Ранее считалось, что эти функции выполняются двумя разными ферментами. Исследованиями автора было показано, что вместо двух узкоспецифичных ферментов имеется один с широкой специфичностью действия. Двойная функция фермента была подтверждена рядом зарубежных исследователей. Образую прессорный пептид и разрушая депрессорный, пептидилдипептидаза является ключевым ферментом двух физиологических систем организма — ренин/ангиотензиновой и кининовой. Фермент способствует поддержанию сосудистого тонуса в организме и участвует в защитных компенсаторных реакциях, направленных на восстановление сосудистого тонуса при терминальных состояниях, а также стимулирует синтез альдостерона, в особенности при нарушениях водно-солевого баланса.

Доклад Л. П. А л е к с е е н к о «Протеолитические ферменты гипоталамо-гипофизарной системы» посвящен вопросам, связанным с регуляцией образования гормонов гипоталамуса и гипофиза, которые являются веществами полипептидной природы. Показано, что молекулы белков — гормонов гипофиза — синтезируются в виде неактивных предшественников, так называемых препрогомонов, которые активируются протеолитическими ферментами. Гормоны гипофиза стимулируют увеличение активности пептидаз гипоталамуса, разрушающих соответствующие либерины. Таким образом осуществляется саморегуляция выделения в кровь гормонов гипофиза. Регуляция выделения гипофизарных гормонов с помощью протениаз возможна также через разрушение статинов. Под действием протениаз гормоны гипофиза могут превращаться в новые физиологически активные пептиды: липотропин превращается в эндорфины — морфиноподобные вещества, а кортикотропин — в меланотропин. Автором совместно с В. Н. Ореховичем и Н. Н. Золотовым обнаружены и выделены в адеиногипофиза два новых фермента: пролил-аланин-пептидилгидролаза — тиоловый фермент с оптимальным действием в щелочной среде и кислая пролилкарбоксипептидаза. Изучены их свойства и специфичность действия.

Доклад Т. С. П а с х и н о й «Тканевые кининогеназы: свойства, распространение, механизм катализа кининогеназной реакции» посвящен процессам кининогеназа в организме, которые катализируются несколькими группами узкоспецифических трипсиноподобных сериновых протениаз, кининогеназ (кининогенинов, калликреинов). Они локализованы в плазме крови, секретах и тканях. Тканевые и секреторные кининогеназы составляют обширную группу специфических протениаз с близкими физико-химическими и каталитическими свойствами. Ферменты этой группы найдены в железах внешней секреции, тканях почки и тонкого кишечника. Основные свойства, присущие группе тканевых кининогеназ, а также особенности, обусловленные их различной органной локализацией и видовой специфичностью, продемонстрированы на примерах изучения свойств препаратов панкреатического калликреина свиньи, калликреинов слюны и мочи человека, а также калликреинов из почки крысы. Механизм декининирования кининогена плазмы крови тканевыми калликреинами освещен на основании модельных исследований, проведенных в лаборатории докладчика, а также современных данных литературы.

В докладе Ю. М. В а с и л ь е в а и соавт. суммированы результаты проводимых авторами исследований по изучению механизмов контактных взаимодействий нормальных и трансформированных фибробластов и эпителиальных клеток в культуре. Показано, что образование специализированных контактных структур является результатом особой клеточной реакции, названной реакцией активного прикрепления. Главным фенотипическим нарушением, типичным для трансформированных онкологических фибробластов эпителиальных клеток, является дефектность реакций активного прикрепления. Предполагается, что этот процесс связан с нарушением взаимодействий рецепторов мембраны с микрофиламентами подмембранного кортикального слоя. Возникновение контактных структур является обратимым процессом. Такие структуры могут быть разрушены протениазами и другими агентами, обратимо переводящими клетки в неприкрепленное состояние. Действие таких диссоциирующих агентов приводит к изменениям белкового состава клетки, изменениям кортикального слоя и топографии поверхности.

Симпозиум «Биохимические основы наследственных заболеваний, связанных с нарушением обмена углеводов (моносахаридов, полисахаридов и гликоконъюгатов)», организованный совместно с Московским научно-исследовательским Институтом педиатрии и детской хирургии Министерства здравоохранения РСФСР, был посвящен вопросам биохимической диагностики врожденных заболеваний, связанных с недостаточностью ферментов обмена углеводов и гликобиополимеров. Это второй симпозиум, посвященный этой проблеме. На симпозиуме были заслушаны доклады, касающиеся как теоретических аспектов наследственных заболеваний, обусловленных недостаточностью гликозидаз, так и связанные с практическими вопросами пренатальной диагностики и лечения.

В докладе Г. Я. В и д е р ш а й н а были рассмотрены биохимические основы наследственных болезней, развивающихся при недостаточности гликозидаз — гликолипидозов и гликопротеинозов. В докладе были рассмотрены биологическая роль углеводсодержащих биополимеров, их биосинтез и наиболее подробно деградация их углеводной части с помощью специфических гликозидаз. Автор привел данные о свойствах и множественных формах гликозидаз, в том числе собственные данные по изучению фукозидаз и галактозидаз. В докладе были подробно рассмотрены имеющиеся в настоящее время сведения относительно характера энзиматического дефекта при всех известных гликолипидозах, гликопротеинозах и мукополисахаридозах, а также современные подходы к энзимотерапии этих заболеваний.

Доклад Н. Н. Н и к о л ь с к о г о был посвящен современным представлениям о типах транспортных систем сахаров, а также генетическим нарушениям этого транспорта в клетках животных и человека. В докладе было подчеркнуто, что генетические нарушения транспорта сахаров изучены гораздо меньше, чем другие генетические нарушения углеводного обмена. Лучше всего исследован дефект всасывания углеводов, в частности синдром глюкозогалактозной мальабсорбции, который наследуется по рецессивно-аутосомному типу. Что касается многочисленных работ по наследственному диабету, то автор подчеркнул, что хотя изменения системы регуляции транспорта сахаров в этих случаях несомненны, однако вопрос об их первичности неясен. В докладе приводятся данные по гормональной регуляции транспортных систем под действием адреналина и инсулина.

Вопросы экзоцитоза лизосомальных ферментов, в частности гликозидаз, и возникающие при нарушении этого процесса заболевания были рассмотрены в докладе И. С. Л у к о м с к о й. Хотя истинный механизм «вытекания» лизосомных ферментов из клеток неясен, изучение возникающих при этом заболеваний позволило выявить роль определенных углеводов в качестве маркерных участков для «узнавания» фермента клеткой. Оказалось, что для разных гликозидаз эти маркерные углеводы неодинаковы. Дефекты в синтезе маркерного участка лизосомных ферментов могут приводить к нарушениям экзоцитоза. Исследования маркерных свойств ферментов представляют не только теоретический интерес, но имеют и большое практическое значение при разработке методов энзимотерапии наследственных дефектов обмена, поскольку именно от маркерных свойств фермента будет зависеть его «транспорт» в соответствующие ткани. Эти данные важны и для создания препаратов ферментов направленного действия путем присоединения к ним определенных маркеров, способствующих проникновению ферментов в нужные клетки и ткани.

Интересные результаты были представлены в докладе Р. И. С а л г а н и к а и Н. А. С о л о в ь е в о й, посвященном экспериментальной модели наследственной галактоземии. Авторам удалось вывести линию крыс, высокочувствительных к галактоземическому действию галактозы, и провести генетический анализ признаков наследственной галактоземии у крыс. Авторы показали, что такие признаки заболевания, как развитие катаракты и увеличение лимфоидных органов, контролирует доминантный ген, а снижение активности галактозо-1-фосфатуридинтрансферазы — один рецессивный ген. Создание экспериментальных моделей наследственных заболеваний чрезвычайно важно как для изучения молекулярных основ заболеваний, так и для разработки методов заместительной энзимотерапии. В этом смысле данная работа представляет исключительный интерес.

Ряд докладов симпозиума был непосредственно связан с вопросами биохимической диагностики наследственных болезней накопления и их рациональной лекарственной и диетотерапии. Так, в докладе Е. Л. Р о з е н ф е л ь д были даны современные представления об особенностях обмена гликогена в норме и при наследственных заболеваниях и в связи с этим представлены атипичные случаи гликогеновой болезни, диагностированные в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР. На этих примерах была продемонстрирована необходимость всесторонних исследований углеводного обмена как путем нагрузочных проб, так и с помощью анализа активности ферментов в материале биопсий.

Доклад И. С. Р о з о в с к о г о был посвящен задачам и возможностям пренатальной диагностики некоторых врожденных патологий плода. После анализа зарубежных исследований по этому вопросу автор представил данные, полученные на базе Института акушерства и гинекологии относительно показаний к проведению диагностического амниоцентеза и осложнений после него. Обсуждены возможности использования культуры клеток амниотической жидкости для определения кариотипа плода, а также выявления биохимических дефектов при отягощенной по некоторым за-

болеваниям наследственности. Автор остановился также на расширении возможностей пренатальной биохимической диагностики наследственной патологии в связи с применением фетоскопии, позволяющей получить образцы крови, а при особых показаниях и кожи плода. Оценка значения исследования провизорных органов для пренатальной диагностики была дана в докладе А. И. Брусиловского и соавт.

В ряде докладов было продемонстрировано использование современных биохимических методов для пренатальной и постнатальной диагностики наследственных болезней, связанных с недостаточностью гликозидаз. Так, в докладе И. В. Цветковой и Т. В. Золотухиной были представлены данные по активности различных гликозидаз в культуре клеток амниотической жидкости, необходимые для проведения диагностических анализов с целью выявления болезни плода. Анализ свойств β -галактозидазы, выделенной из печени больного ганглиозидозом ГМ₁, проведен Л. Калайджиевой, которая затронула также вопросы патогенеза данного ганглиозидоза. Выявлению наследственных заболеваний, обусловленных недостаточностью гликозидаз, был посвящен доклад К. Д. Краснополской и Л. В. Сороковых. Авторы представили данные по биохимической диагностике этих заболеваний у детей с отставанием в умственном и физическом развитии и у некоторых ортопедических больных.

В целом представленные на симпозиуме доклады подытожили накопленные к настоящему времени данные о биохимических особенностях наследственных лизосомных болезней и возможностях пренатальной диагностики. Материалы симпозиума представляют интерес не только для исследователей, изучающих химические основы патологии, но и для специалистов, работающих в области практической медицины. Труды симпозиумов будут опубликованы.

Н. И. Соловьева, И. В. Цветкова (Москва)

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

✓ Инсарова И. Д., ✓ Замараева Т. В., ✓ Мазуров В. И. Коллагеназы животного происхождения	3	Inсарова, I. D., Zamaraeva, T. V., Mazurov, V. I.: Collagenases of Animal Origin
Шапошников А. М., Хальчицкий С. Е., Шварц Е. И. Нарушение обмена фенилаланина и тирозина при болезни Дауна . . .	15	Shaposhnikov, A. M., Khalchitsky, S. E., Shwartz, E. I.: Impairment of Phenylalanine and Tyrosine Metabolism in Monogolism
Рачев Р. Р., Димитров М. И. Действие тиреоидных гормонов на синтез белка в микросомах in vitro	20	Rachev, R. R., Dimitrov, M. I.: Effect of Thyroid Hormones on Protein Synthesis in Microsomes in Vitro
Рачев Р. Р., Димитров М. И., Филипова Е. Х. Влияние трийодтиронина и ICl на синтез белка в бесклеточных системах . .	26	Rachev, R. R., Dimitrov, M. I., Filipova, E. Kh.: Effect of Triiodothyronine and ICl on Protein Synthesis in Cell-Free System
Кильдема Л. А. Чувствительность гексокиназы и глюкокиназы к гормональному воздействию при гепатоканцерогенезе	36	Kil'dema, L. A.: Sensitivity of Hexokinase and Glucokinase to Hormonal Effect of Hepatocarcinogenesis
Ляпина Л. А., Струкова С. М., Кудряшов Б. А. Образование комплекса гепарина с протромбином	41	Lyapina, L. A., Strukova, S. M., Kudryashov, B. A.: Formation of Complex Heparin-Prothrombin
✓ Чибисов И. В., ✓ Розенфельд Е. Л., Чистова Л. В., Леонтьев А. Ф. Гликогеновая болезнь, вызванная дефектами фосфорилазной системы печени . .	47	Chibisov, I. V., Rosenfeld, E. L., Chistova, L. V., Leont'ev, A. F.: Glycogenic Disease, Caused by Impairments in Phosphorylase System of Liver Tissue
✓ Розе Л. В., ✓ Попова И. А. Влияние норадrenalина и серотонина на обмен гликогена в тканях крысы	50	Rose, L. V., Popova, I. A.: Effect of Noradrenaline and Serotonin on Glycogen Metabolism in Rat Tissues
Плесков В. М., Солитернова И. Б. О нервной регуляции активности ферментов энергетического обмена различно функционирующих скелетных мышц кролика	55	Pleskov, V. M., Soliternova, I. B.: On the Neural Regulation of Enzymes of Energy Metabolism in Dissimilarly Acting Rabbit Skeletal Muscles
Усатенко М. С., Берлин Г. И. Активность и изоферментный состав лактатдегидрогеназы и малатде-		Usatenko, M. S., Berlin, G. I.: Activities and Isozyme Spectra of Lactate and Malate Dehydrogenases in Blood

- гидрогеназы в сыворотке крови и эритроцитах новорожденных детей с гемолитической болезнью
- 59 Арбузов В. А. Деградация мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом в клетках печени крыс на фоне действия актиномицина D и циклогексимида
- 62 Черников М. П., Николаевская В. Р., Стан Е. Я. Активность трипсина и химотрипсина в период раннего постнатального развития крыс
- 67 Рожанец В. В., Промыслов, М. Ш., Габриэлян Н. И., Щербанева О. И. Ингибирующее влияние ликвора на активность натрий-, калий-АТФ-азы синаптических мембран головного мозга животных
- 71 Лопухин Ю. М., Беркович М. А., Пятницкий Н. Н., Арчаков А. И., Гуляев А. А., Сергиенко В. И. Экстракция холестерина из стенки сосуда поверхностно-активными веществами и органическими растворителями
- 75 Замараева М. В., Гагелганс А. И., Ташмухамедов Б. А. О влиянии тиреоидных гормонов на кальциевый насос саркоплазматического ретикула
- 78 Бышевский А. Ш., Галлян С. Л., Рудзевич Е. Л. Витамин К-зависимый ингибитор тромбообразования
- 82 Исаева В. А., Алексеева И. А., Блажеевич Н. В., Спиричев В. Б. Экспериментальная недостаточность витамина D при различном соотношении кальция и фосфора в рационе
- 86

Методы биохимических исследований

- Гончаров Н. П., Чекал С., Антоничев А. В., Качия Г. В., Бутнев В. Ю., Дисфалузи Е. Радиоиммунологический метод определения 11 стероидов в малом объеме плазмы крови обезьян
- 92 Царюк Л. А., Рыбачук В. Н., Шевченко Л. И., Толстых В. М. Определение концентрации фибриногена плазмы крови методом сульфитного осаждения
- 97 Филиппова Л. Б., Розанов А. Я. Микрометод получения и очистки меченого 4-метил-5β-оксиптилатиазола
- 102

Рецензия

Хроника

Serum and Red Blood Cells of Newborn Children with Hemolytic Disease

- Arbusov, V. A.: Degradation of mRNA from Membrane-Bound and Free Polyribosomes in Cells of Liver of Rats Pretreated with Actinomycin D and Cycloheximide
- Chernikov, M. P., Nikolaevskaya, V. R., Stan, E. Ya.: Activities of Trypsin and Chymotrypsin at Early Postnatal Development of Rats
- Rozhanets, V. V., Promyslov, M. S., Gabrielyan, N. I., Sherbanjova, O. I.: Inhibitory Effect of Liquor Cerebrospinalis on the Activity of Na,K-ATPase from Mammalian Brain Synaptic Membranes
- Lopukhin, Yu. M., Berkovich, M. A., Pyatnitsky, N. N., Archakov, A. I., Guliaev A. A., Sergienko V. I. Extraction of Cholesterol from Vessel wall by Surface-Active Substances and Organic Solvents
- Zamaraeva, M. V., Gagel'gans, A. I., Tashmukhamedov, B. A.: On the Effect of Thyroid Hormones on Calcium Pump in Sarcolemmal Reticulum
- Byshhevsky, A. Sh., Galyan, S. L., Rudzевич, E. L.: Vitamin K is a Dependent Inhibitor of Thrombinoformation
- Isaeva, V. A., Alexeeva, I. A., Blazheevich, N. V., Spirichev, V. B.: Experimental Insufficiency of Vitamin D at Various Ratios Ca : P in a Diet

Methods of Biochemical Investigations

- Goncharov, N. P., Čekan, S., Antonichev, A. V., Kachiy, G. V., Butnev, B. Yu., Dizfalussy, E.: A Radioimmunological Method for Estimation of 11 Steroids in Small Samples of Monkey Blood Plasma
- 92 Tsaryuk, L. A., Rybachuk, V. N., Shevchenko, L. I., Tolstyykh, V. M.: Estimation of Fibrinogen Concentration in Blood Plasma by Sulfite Precipitation
- 97 Filippova, L. B., Rozanov, L. Ya.: The Micromethod for Production and Purification of Labelled 4-Methyl-5β-Hydroxyethyl Thiazole

Book Reviews

Current Events