

С. М. Бычков, М. М. Захарова

НОВЫЕ ДАННЫЕ О ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНАХ И ПРОТЕОГЛИКАНАХ

Научно-исследовательская лаборатория Министерства здравоохранения СССР, Институт ревматизма АМН СССР, Москва

Дан обзор важнейших исследований, выполненных за последние 5—7 лет, в области гликозаминогликанов и протеогликанов. Рассмотрены вопросы о первичных повторяющихся структурах гликозаминогликанов и о связях этих биополимеров с белковыми компонентами в протеогликанах. Приведены данные о конформационных особенностях гликозаминогликанов, различных комплексах, агрегатах протеогликанов и распределении этих биополимеров в органах, тканях и клетках; кратко рассмотрен вопрос о поведении протеогликанов в различных растворах.

Результаты исследований в области гликозаминогликанов и протеогликанов, выполненных за последние 5—7 лет, привели во многих отношениях к глубоким изменениям наших знаний об этих биополимерах. В настоящей статье рассматриваются новые, имеющие принципиальное значение данные, главным образом о химической природе гликозаминогликанов и протеогликанов, их распределении в животном организме, и ряд других вопросов, близких к этим проблемам.

Ранее применяемые методы для изолирования из тканей гликозаминогликанов с использованием для таких целей протеолитических ферментов дали возможность выделить препараты этих веществ, содержащих лишь небольшие количества ковалентно связанных пептидов, что считалось критерием их чистоты, химической однородности и индивидуальности. Изучение таких препаратов гликозаминогликанов выявило в основных чертах первичную повторяющуюся структуру этих веществ и природу связи между углеводным и полипептидным (белковым) компонентами в соответствующих протеогликанах. В табл. 1 приведены все известные в настоящее время гликозаминогликаны и их первичные повторяющиеся структуры. Следует иметь в виду, что данные о таких структурах гликозаминогликанов до настоящего времени в ряде случаев уточняются и даже значительно изменяются в свете новых исследований [1].

Очень сложным оказался вопрос о первичной повторяющейся структуре гепарина. Доказано (см. табл. 1) наличие в гепарине связей между идуроновой кислотой и глюкозамином (а), а также между глюкуроновой кислотой и этим аминсахаром (б). Не вызывает сомнений и то, что почти все амингруппы глюкозамина, содержащегося в гепарине, сульфатированы. Вопрос же о положении и количестве сульфатных групп в этом биополимере, присоединенных сложноэфирной связью к глюкозамину и гексуриновым кислотам, до настоящего времени остается разрешенным не полностью. Показано, что большая часть аминсахара гепарина сульфатирована по 6-му углеродному атому. В небольшом количестве обнаружены остатки глюкозамина, сульфатированные по 3 и 6 атомам углерода, а также его остатки, совершенно нессульфатированные по углеродам. Около $1/3$ глюкуроновой кислоты в гепарине сульфатировано по 2-му атому углерода [2]. В этой связи следует иметь в виду, что выделенные из различных источников препараты гепарина почти всегда представляют собой смеси отдельных фракций этого гликозаминогликана, различающиеся по составу, молекулярной массе и

биологической активности. Из суммарных препаратов гепарина можно выделить две химически индивидуальные фракции, из которых одна содержит 4, а другая — 3 остатка серной кислоты на дисахаридную повторяющуюся единицу молекулы гепарина. Эти фракции различаются и по аминокислотному составу полипептидных компонентов [3]. Антикоагуляцион-

Т а б л и ц а 1

Первичная повторяющаяся структура гликозаминогликанов

Гликозаминогликан	Структура
Гиалуроновая кислота	$[\rightarrow 4)\text{-O-}\beta\text{-D-глюкопирануранозил-(1}\rightarrow 3)\text{-O-(2-ацетиамидо-2-деокси-}\beta\text{-D-глюкопиранозил)-(1}\rightarrow]$
Хондроитин	$[\rightarrow 4)\text{-O-}\beta\text{-D-глюкопирануранозил-(1}\rightarrow 3)\text{-O-(2-ацетиамидо-2-деокси-}\beta\text{-D-галактопиранозил)-(1}\rightarrow]$
Хондроитин-4-сульфат (хондроитинсульфат А)	$[\rightarrow 4)\text{-O-}\beta\text{-D-глюкопирануранозил-(1}\rightarrow 3)\text{-O-(2-ацетиамидо-2-деокси-}\beta\text{-D-галактопиранозил-4-сульфат)-(1}\rightarrow]$
Хондроитин-6-сульфат (хондроитинсульфат С)	$[\rightarrow 4)\text{-O-}\beta\text{-D-глюкопирануранозил-(1}\rightarrow 3)\text{-O-(2-ацетиамидо-2-деокси-}\beta\text{-D-галактопиранозил-6-сульфат)-(1}\rightarrow]$
Дерматансульфат (хондроитинсульфат В, дерматан, β -гепарин)	$[\rightarrow 4)\text{-O-}\alpha\text{-L-идопирануранозил-(1}\rightarrow 3)\text{-O-(2-ацетиамидо-2-деокси-}\beta\text{-D-галактопиранозил-4-сульфат)-(1}\rightarrow]$
Гепарин	а) $[\rightarrow 4)\text{-O-}\alpha\text{-L-идопирануранозил-2-сульфат-(1}\rightarrow 4)\text{-O-(2-деокси-2-сульфамидо-}\beta\text{-D-глюкопиранозил-6-сульфат)-(1}\rightarrow]$ б) $[\rightarrow 4)\text{-O-}\beta\text{-D-глюкопирануранозил-(1}\rightarrow 4)\text{-O-(2-деокси-2-сульфамидо-}\beta\text{-D-глюкопиранозил)-(1}\rightarrow]$
Кератансульфат (кератансульфат, кератан)	$[\rightarrow 3)\text{-O-}\beta\text{-D-галактопиранозил-(1}\rightarrow 4)\text{-O-(2-ацетиамидо-}\beta\text{-D-глюкопиранозил-6-сульфат)-(1}\rightarrow]$
Гепарансульфат (гепаринсульфат, гепаритин, гепарин)	См. текст

Пр и м е ч а н и е. В скобках даны устаревшие названия.

ная активность фракции, содержащей 4 остатка серной кислоты, в $1\frac{1}{2}$ раза больше таковой фракции, содержащей 3 указанных остатка [4]. Весьма возможно, что в организме фракции гепарина, изолированные из тканей как химически индивидуальные соединения, существуют в виде единого комплекса.

Гепарансульфат, обладающий очень слабой антикоагуляционной активностью, подобно гепарину, состоит из остатков D-глюкозамина, D-глюкуроновой и L-идуроновой кислот. В отличие от гепарина в гепарансульфате большая часть аминсахара ацелирована, а меньшая — сульфатирована по аминогруппе. Предполагается наличие в гепарансульфате β -гликозидной связи между остатками гексозамина и гексуроновыми кислотами [5]. Гепарансульфат — это семейство гликозаминогликанов, отдельные представители которых различаются по соотношению и распределению ацетильных, сульфамидных и O-сульфатных групп, а также по молекулярной массе и действию на них гепариназ и гепариназ бактерий. Изолированы фракции гепарансульфата, имеющие молекулярную массу 3800, 9300, 25 000, 170 000 и более [6, 7]. Ввиду недавно выявленной важной биологической роли гепарансульфата (см. ниже) последний в настоящее время подробно изучается.

В отношении кератансульфата в дополнение к ранее известным данным показано наличие в нем в качестве концевой группы сиаловой кислоты, соединенной через галактозамин с серином или треонином полипептидного компонента [8]. В гидролизатах кератансульфата обнаружены фукоза и манноза [9]. Известны кератансульфат I (из роговицы глаза) и кератансульфат II (из хряща). Различия между ними заключаются в том, что последний содержит около 10% галактозамина от общего количества амино-

сахаров, а также в природе связи с полипептидным компонентом (см. ниже) и др. [10].

Не исключается возможность некоторых изменений и уточнений в отношении структур хондроитинсульфатов. В продуктах энзиматического гидролиза их обнаружены дисахариды, содержащие все сульфатные группы и не содержащие таковых [11].

По данным рентгеноструктурного анализа структура гиалуроната натрия имеет тетрагональную форму со следующими параметрами: $a=b=0,989$ нм и $c=3,394$ нм. Две полисахаридные цепи расположены антипараллельно друг к другу. Каждая цепь представляет собой левозакрученную четырехкратную спираль дисахаридных единиц. Цепи соединены водородными связями между гликозидными связями (1→3) и (1→4), а также между азотом ацетамидной группировки и кислородом. Кроме того, имеется координационная связь между соседними полисахаридными цепями, образованная катионом натрия и атомами кислорода. Тетрагональная форма является стабильной при влажности, близкой к нулю. При высокой влажности препарата устанавливается орторомбическая форма ($a=1,153$ нм, $b=0,989$ нм, $c=3,386$ нм). В такой форме спираль гиалуроната является двукратной с тетрасахаридными единицами, конформация которой сходна с таковой четырехкратной спирали тетрагональной формы. В орторомбической форме все указанные водородные и координационные связи, имеющиеся в тетрагональной решетке, замещены мостиками воды, 4 из которых ассоциированы с каждой тетрасахаридной единицей [12].

При рентгеноструктурном анализе было выявлено, что макромолекулы хондроитин-4- и 6-сульфатов, дерматансульфата, кератансульфата, гепарансульфата и гепарина имеют также спиральную конформацию с присущими каждому данному биополимеру частными особенностями. Примесь небольших количеств другого гликозаминогликана, наличие воды и ионов в препаратах может изменить конформацию главного компонента. Сульфатированные гликозаминогликаны, содержащиеся в протеогликанах (см. ниже), также обладают спиральной конформацией [13].

Доказано, что гликозаминогликаны в нормальном организме существуют только как ковалентные соединения с белками (или полипептидами),

Т а б л и ц а 2

Тип связей гликозаминогликанов с белковым компонентом в протеогликанах

Тип	Связующая структура
I	O-β-D-галактопиранозил-(→4)-O-β-D-галактопиранозил-(1→4)-O-β-D-ксилопиранозил-(1→серин...
II	2-ацетамидо-1[(β-L-аспарагинил)амино]-2-деокси-β-D-глюкозамин
III	O-2-ацетамидо-2-деокси-D-галактопиранозил-треонин...

т. е. в форме протеогликанов. Даже гиалуроновая кислота, считавшаяся типичным гликозаминогликаном, также содержит ковалентно связанный белковый компонент, правда, в очень незначительном количестве [14].

Выделение из тканей недеградированных протеогликанов возможно только в том случае, если исключить использование при этом протеолитических ферментов, а очистку и фракционирование осуществлять посредством получения комплексов данных протеогликанов с различными основаниями и применения современных методов препаративной биохимии.

Известны три типа структур, за счет которых образуются ковалентные соединения гликозаминогликанов с белками, в результате чего образуются протеогликаны (табл. 2). Соединение хондроитин-4- и 6-сульфатов, дерматансульфата, гепарансульфата и гепарина осуществляется за счет группировки, обозначенной в табл. 2, как тип I. В этом случае связующей аминок-

кислотой белкового компонента является серин. Интересно, что в случаях гепарансульфата и гепарина в части гликозаминогликана, непосредственно соседствующей с участком, за счет которого образуется связь с белком, содержатся исключительно ацетилированные по аминогруппе аминоксахара. По II типу связь гликозаминогликанового компонента с белковым компонентом происходит за счет глюкозамина и аспарагиновой кислоты. III тип связи заключается в соединении остатка галактозамина с остатком треонина [1]. II тип связи присущ кератансульфату I, а III — кератансульфату II [15, 16].

Белковые компоненты всех протеогликанов отличаются высоким содержанием серина, треонина и дикарбоновых аминокислот [1, 17].

Сравнительно недавно доказано, что во всех тканях клеток, их ядрах и клеточных органоидах в том или ином количестве содержатся протеоглика-

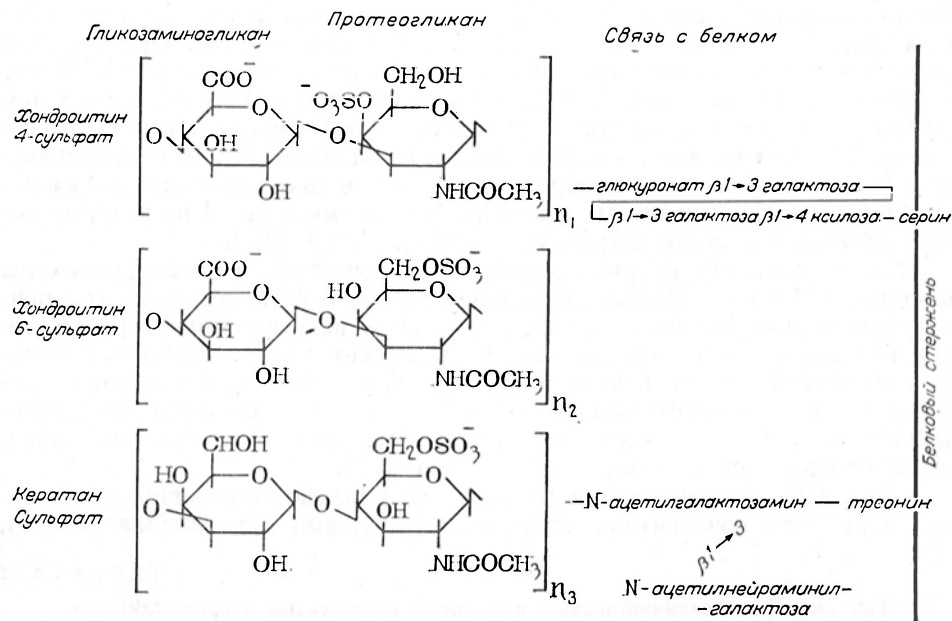


Рис. 1. Структура протеогликана хряща.

ны, представляющие собой сложные комплексы, построенные из нескольких различных гликозаминогликанов, соединенных ковалентно с одним общим белковым компонентом в единую макромолекулу. Наиболее изученными в химическом отношении из таких биополимеров являются протеогликианы гиалинового хряща (носовой перегородки, трахеальных колец, суставов, межпозвоночных дисков). Из этой ткани выделен протеогликан, состоящий из хондроитин-4- и 6-сульфатов и кератансульфата, соединенных одним белковым компонентом, который часто называют стержнем или сердцевиной [17—19]. В основных чертах установлена структура этого протеогликана [15, 18, 20, 21]. Гликозаминогликаны, присоединенные в поперечном направлении по отношению к продольной оси белкового стержня, образуют щеткообразную структуру данного протеогликана (рис. 1).

В гиалиновом хряще выявлено наличие так называемых агрегирующихся и неагрегирующихся протеогликанов. Не соблюдая строго хронологическую последовательность в отношении отдельных исследований по данному вопросу, что необходимо для стройности и краткости обзора, приведем основные результаты, достигнутые в этой области. Изучение смешанных растворов высокой ионной силы показало, что в присутствии гиалуроната (0,7%) наблюдается увеличение гидродинамического объема макромолекул

протеогликана, коэффициентов внутренней вязкости и седиментации, что вызывалось связыванием одной молекулой гиалуроната многих молекул протеогликана. Такие агрегаты возникают за счет нековалентной связи, и они могут легко диссоциировать [22, 23—29].

Экстракцией солевыми растворами высокой ионной силы (4 М гуанидингидрохлорид, 2—3 М хлорид магния) из гиалинового хряща выделены агрегаты протеогликанов в диссоциированной форме, которые вновь образуют недиссоциированные агрегаты при понижении ионной силы раствора. В этих условиях в растворе обнаруживаются высокомолекулярные агрегаты ($S_0 \sim 40—60$) и неагрегированные молекулы протеогликанов значительно меньшей молекулярной массы ($S_0 \sim 25$). Крупные агрегаты в подходящих условиях могут диссоциировать на $S^{2.5}$ частицы [21, 22—33]. Из агрегатов выделена гиалуроновая кислота и особый белок, называемый связующим белком. Этот белок имеет большое значение в образовании агрегатов протеогликанов в тканях, поскольку в его отсутствие они не могут возникать (см. ниже), хотя в эксперименте (в растворах) его присутствие не является обязательным для агрегирования протеогликанов и гиалуроната [30]. В агрегатах на одну молекулу гиалуроновой кислоты приходится 20—100 молекул протеогликана, связанного с этой кислотой. К гиалуроновой кислоте протеогликан может присоединиться только одним участком, расположенным на конце его белкового стержня. Агрегирующиеся протеогликаны способны связывать даже небольшие осколки гиалуроновой кислоты [27—29]. Участок протеогликанового белкового стержня является специфическим для гиалуроновой кислоты и по своим размерам очень мал, так как длина дисахаридной единицы составляет около 5 нм, а по расчетным данным минимальное расстояние между соседними смежными протеогликапами, соединенными с гиалуроновой кислотой, составляет около 20 нм. По-видимому, боковые цепи хондроитинсульфатов протеогликана ограничивают близость его молекул, присоединенных к гиалуроновой кислоте, в агрегате. Протеогликаны, от которых значительная часть хондроитинсульфатов удалена бактериальной хондроитинсульфатазой, связываются гиалуроновой кислотой более прочно, чем неизмененные таким способом протеогликаны [31]. Полное отщепление хондроитинсульфатов от протеогликана указанным ферментом, в результате чего в протеогликане остается только кератансульфат, не приводит к потере образовавшимися субъединицами способности в присутствии связующего белка образовывать агрегаты с гиалуроновой кислотой. Из этого следует, что хондроитинсульфаты не имеют решающего значения в образовании агрегатов [30, 32].

Связующий белок стабилизирует связь между протеогликаном и гиалуроновой кислотой. Агрегаты, возникающие в присутствии этого белка, имеют более высокий коэффициент седиментации, чем агрегаты, полученные вне ткани без этого белка [34, 35]. Конформация участка белкового стержня протеогликана, необходимая для соединения протеогликана с гиалуроновой кислотой, поддерживается в активном состоянии дисульфидными группами связующего белка. Разрушение и блокирование дисульфидных связей указанного белка приводят к образованию продукта, препятствующего агрегированию протеогликана и гиалуроновой кислоты [29]. Кроме того, этот участок связующего белка содержит значительное количество метионина и аспарагиновой кислоты. Места протейнового стержня, к которым присоединены хондроитинсульфаты и кератансульфат, защищены от протеолитической деградаци в агрегатах экранирующим эффектом связующего белка и гиалуроновой кислотой [34, 36].

При электронно-микроскопических исследованиях было выявлено, что агрегаты протеогликанов с гиалуроновой кислотой, выделенные из суставного хряща крупного рогатого скота, состоят из протеогликановых субъединиц, расположенных через регулярные интервалы (20—40 нм) противоположно по бокам гиалуроновой кислоты. Длина нитей гиалуроновой кислоты в индивидуальных агрегатах составляет от 400 до 4000 нм, что и

определяет размеры агрегатов [32, 34]. Полидисперсность агрегатов определяется количеством присоединенных протеогликанов и гиалуроновой кислоте, длиной макромолекулы этой кислоты и дисперсностью самих протеогликанов, отдельные фракции которых различаются содержанием хондроитинсульфатов и кератансульфата, а соответственно этому и молекулярной массой [21, 35, 37, 38].

Схематично образование агрегатов и их структура изображены на рис. 2 [32].

Из различных видов хряща экстракцией солевыми растворами слабой ионной силы или водой выделены фракции протеогликанов, неспособные

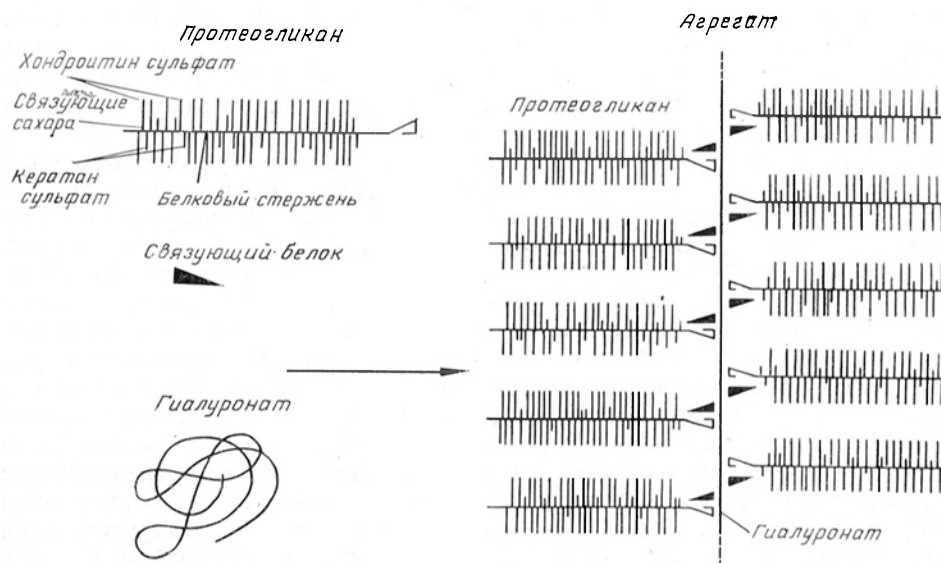


Рис. 2. Схема образования и структура агрегата протеогликана хряща.

образовывать агрегаты с гиалуроново́й кислотой, т. е. неагрегирующиеся протеогликаны данной ткани. На их долю приходится 10—20% от общего содержания протеогликанов хряща. Белковый компонент этих протеогликанов отличается от такового агрегирующихся протеогликанов значительно меньшими размерами, более высоким содержанием треонина и глицина, а также отсутствием цистеина. Показано, что неагрегирующиеся протеогликаны не являются метаболическими предшественниками агрегирующихся протеогликанов хряща [29, 35].

Вряд ли в гиалиновом хряще содержатся только протеогликаны, относящиеся к агрегирующейся и неагрегирующейся фракциям. Из полулунного хряща коленного сустава человека изолирован протеогликан, гликозаминогликаны которого представляют собой хондроитин-6-сульфат и дерматансульфат, а белковый компонент содержит большое количество серина [39].

Исследования антигенных свойств протеогликанов хряща имеют большое значение не только в иммунологическом смысле, но и в отношении методов идентификации этих биополимеров и их структурных компонентов, а также в изучении их биосинтеза. Хондроитинсульфаты и кератансульфат, освобожденные от белкового компонента действием папаина, не вызывают образования антител [40]. При разделении агрегатов протеогликанов хряща носовой перегородки крупного рогатого скота и свиньи на продукты их диссоциации было показано, что видоспецифические детерминанты ассоциированы с связующим белком. Видонеспецифические же детерминанты находятся в полипептидных участках белкового стержня между двумя це-

пами хондроитинсульфатов и у многих видов имеют сходный аминокислотный состав [40—42].

Вопрос о наличии в различных органах, тканях и клетках протеогликанов является исключительно сложным. Определенные протеогликаны могут содержаться в одной и той же ткани в виде нескольких фракций, различающихся по указанным выше характеристикам. Во многих исследованиях, результаты которых приведены ниже, изучено наличие в различных тканях тех или иных гликозаминогликанов, а не протеогликанов, поскольку исходный материал авторы обрабатывали протеолитическими ферментами или, выделяя из него протеогликаны, изучали только их гликозаминогликановые компоненты. В настоящей статье это отмечается по ходу изложения материала.

Из роговицы глаза выделен протеогликан, отличающийся сложностью набора гликозаминогликановых компонентов. Один из них (типа кератансульфата) содержит два остатка маннозы, остатки глюкозо-6-сульфата и нейраминной кислоты. В белковом компоненте в значительном количестве имеется аспарагиновая кислота. Структура этого протеогликана окончательно еще не выяснена [43]. В стекловидном теле глаза, помимо гиалуроновой кислоты, обнаружен протеогликан, содержащий гепарансульфат и хондроитин-4-сульфат [44]. В артериях человека содержится протеогликан, имеющий в своем составе хондроитин-6-сульфат, дерматансульфат и гепарансульфат. В зависимости от стадии развития атеросклеротических изменений в протеогликанине изменяется соотношение между содержанием гликозаминогликанов и белковым компонентом [45]. Из хондросаркомы человека выделена смесь протеогликанов, содержащих гиалуроновую кислоту, хондроитинсульфаты, кератансульфат и белок. Предполагается наличие в этой опухоли агрегатов протеогликанов [46]. Агрегаты протеогликанов обнаружены в хондросаркоме крыс. Связующий белок таких агрегатов отличается по аминокислотному составу от такого же белка агрегатов нормального хряща крыс [47].

Отмечаются определенно выраженные возрастные изменения в гликозаминогликановом составе протеогликанов. В протеогликанах межпозвоночных дисков человека и собак с возрастом происходит увеличение содержания кератансульфата и сиаловых кислот, уменьшение размеров молекул и значительное усиление взаимодействия протеогликанов с коллагеном [48—50]. Соотношение между агрегирующей и неагрегирующей фракциями протеогликанов также зависит от возраста. В морфологически и гистологически нормальном хряще бедра и трахеальных колец старых людей значительная часть протеогликанов не существует в виде агрегатов. В выделенных из такого хряща протеогликанах экстракцией солевыми растворами высокой ионной силы отсутствует связующий белок. Прибавление к растворам этих протеогликанов гиалуроновой кислоты не вызывает образования агрегатов. Предполагается, что с возрастом, помимо ослабления биосинтеза связующего белка, происходят изменения в белковом стержне протеогликанов, в результате чего они теряют способность соединяться с гиалуроновой кислотой и образовывать агрегаты [51, 52].

Уменьшение количества агрегатов протеогликанов и изменение их растворимости происходят в хряще при артритах и остеоартритах [39, 53].

Метод тканевых культур позволяет решить ряд проблем протеогликанов. Однако данные, полученные таким способом, иногда нуждаются в существенных поправках при использовании их для объяснения процессов, происходящих в организме. Из культуры хондроцитов эмбриона курицы выделена фракция протеогликанов, состоящая из 85% хондроитин-4- и 6-сульфатов, 7% кератансульфата, 7% белка, некоторого количества несulfатированного гликозаминогликана и связующего белка, молекулярная масса которого составляет 45 000. На 8-й день культивирования около 70% протеогликанов находится в виде агрегатов [54]. Легко можно выделить

гепарин и гепариноподобные гликозаминогликаны из культуры эндотелиальных клеток аорты [55].

Оказалось, что D-ксилоза и различные β -D-ксилозиды способны инициировать и стимулировать в культурах фибробластов синтез гликозаминогликанов, превышающий нормальный уровень данного процесса, но количество протеогликанов при этом уменьшается. По-видимому, ксилозиды препятствуют связи гликозаминогликана с белковым компонентом, образующейся между остатками ксилозы и серина [56—58].

Согласно современным исследованиям, клеточные мембраны позвоночных животных, помимо таких углеводсодержащих соединений, как гликопротеиды и гликолипиды, имеют в своем составе и протеогликаны. Из общего количества протеогликанов, содержащихся в мембранах культуральных фибробластов человека, гиалуроновая кислота составляет 40%, хондроитинсульфаты — 35% и гепарансульфат — 25% [59]. Фракции гепарансульфата, различающиеся по количеству сульфатных групп, присоединенных по аминогруппам и гидроксилам, аминокислотному составу полипептидных остатков и растворимости, выделены из мембран ряда клеток китайского хомяка [60, 61].

По-видимому, протеогликановый состав клеточных мембран отличается значительным разнообразием. В плазматических мембранах клеток печени крыс содержатся протеогликаны, гликозаминогликаны которых устойчивы к действию хондроитиназ и гиалуронидаз, а в таких же мембранах гепатомы этих животных обнаружены хондроитинсульфаты и другие неидентифицированные гликозаминогликаны [62].

Принципиальный интерес представляет вопрос о протеогликанах ядер клеток. Из ядер клеток мышинной меланомы выделены протеогликаны, важнейшими компонентами которых являются хондроитинсульфаты с высокой молекулярной массой и гепарансульфат [63]. В ядрах печени крыс доказано наличие гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфатов, причем первая содержится в преобладающем количестве. Большая часть гликозаминогликанов ассоциирована с хроматиновой фракцией [64]. Таким образом, положительно решен вопрос, долгое время бывший спорным, о наличии протеогликанов в ядрах клеток, что, однако, давно было установлено [65].

В настоящее время доказано, что каждый орган животного организма характеризуется определенным, отличающимся от других органов данного животного, содержанием хондроитинсульфатов и соотношением между количествами их изомеров, дерматансульфата, гепарансульфата, а также физическими характеристиками этих биополимеров. Более того, типичная для органов композиция в содержании гликозаминогликанов наблюдается и в митохондриях, выделенных из клеток тех же органов [66]. При изучении распределения гликозаминогликанов в органах млекопитающих (морская свинка, кролик, собака, лошадь, крупный рогатый скот) было выявлено, что одни и те же органы различных видов животных содержат одни и те же гликозаминогликаны и приблизительно в одинаковых количественных соотношениях, но наблюдаются различия в их молекулярной массе. Период роста животного сопровождается значительными сдвигами в содержании сульфатированных гликозаминогликанов в тканях. В первый день постнатального развития у кроликов и крыс в большинстве органов хондроитинсульфаты, дерматансульфат и гепарансульфат содержатся приблизительно в равных количествах, в то время как у взрослых животных содержание хондроитинсульфатов значительно меньше, чем других сульфатированных гликозаминогликанов. Растущие опухоли различного происхождения характеризуются высоким содержанием хондроитинсульфатов. В постнатальном развитии, при росте опухолей и культур тканей наиболее высокое содержание хондроитинсульфатов и гепарансульфата наблюдается в экспоненциальной фазе роста [67, 68]. Эти факты, а также наличие и характерное распределение сульфатированных протеогликанов у всех изученных в этом отношении беспозвоночных животных и отсутствие данных биополимеров у

простейших и бактерий дают основание полагать, что своеобразный набор сульфатированных протеогликанов, присущий органам и тканям, имеет прямое отношение к их организации и функциям. Данные биополимеры играют важную роль в клеточном делении, узнавании клетками друг друга, адгезии их и росте тканей.

[Механизм регулирующего действия хондроитинсульфата на рост тканей еще не выяснен. Допускается, что хондроитинсульфаты каким-то образом конкурируют с имеющимися на поверхности клеточной мембраны сульфатированными протеогликанами, важнейшим из которых, по-видимому, является гепарансульфат. Возможно, что при этом происходит нарушение правильного функционирования систем узнавания клеток [68]. В некоторой степени указанные представления согласуются с тем, что гепарансульфат представляет собой наиболее распространенный из всех сульфатированных гликозаминогликанов клеточный компонент, содержащийся во всех, даже строго специализированных, клетках [60].

Наличие в животном организме протеогликанов, состоящих из различных гликозаминогликанов, организованных белковым компонентом в единые макромолекулы, создающих в свою очередь при участии других протеогликанов и белков еще более крупные агрегаты, представляет собой проявление общей биологической закономерности, согласно которой жизненно необходимые функции осуществляются комплексными системами биополимеров. В эластиновой ткани этот принцип выражен в наиболее конкретной форме. Находящиеся в ней агрегаты протеогликанов обеспечивают этой ткани высокую эластичность и обратимую резистентность к сжатию.

Участие гиалуроновой кислоты в образовании указанных выше агрегатов определенных протеогликанов хряща значительно расширяет наши знания о биологической роли этой кислоты. Хотя такие агрегаты обнаружены только в хряще и различных новообразованиях этой ткани, однако имеются веские основания полагать, что гиалуроновая кислота в силу физических и химических ее особенностей вообще обладает свойством организовывать сложные компоненты тканей и клеток в различные комплексы, агрегаты и ассоциаты, что подтверждается и ее распространением в организмах на всех структурных уровнях. Некоторые клетки имеют специфические рецепторы гиалуроновой кислоты [69]. Гиалуроновая кислота является единственным столь широко распространенным несulfатированным гликозаминогликаном, макромолекула которого представляет собой длинную гибкую цепь с молекулярной массой, превышающей таковую всех других протеогликанов. Эти особенности и определяют своеобразную роль гиалуроновой кислоты как фактора, организующего агрегаты и различные ассоциаты. О гораздо более разносторонней роли гиалуроновой кислоты, чем до сих пор предполагали, свидетельствует и то, что при добавлении ее к суспензии культуры хондроцитов она подавляет биосинтез сульфатированных протеогликанов, что, однако, зависит от условий культивирования и способа взятия для этого клеток из исходной ткани. Гиалуроновая кислота, содержащаяся в агрегатах протеогликанов хряща, этот синтез не подавляет [70]. Вопрос о хондроитине, также не содержащем сульфата, во многих отношениях не выяснен. Во всяком случае распространение его в организме весьма ограничено.

Протеогликаны, несущие сильный отрицательный электрический заряд, могут создавать электрическое поле исключительно высокой напряженности. Такой заряд и большое количество гликозаминогликановых цепей, расположенных вокруг белкового стержня в макромолекулах протеогликанов, а также их высокая молекулярная масса ($2-3 \times 10^6$) создают возможность захвата ими огромного количества воды на единицу массы и образования трехмерных структур в растворах. Эти особенности вызывают пространственное разделение компонентов в растворах, состоящих из протеогликанов и белков, а также других веществ небелковой природы. Протеогликаны, за-

полняя значительную часть пространства раствора, уменьшают в нем объем, доступный для белка и других находящихся в нем веществ, что повышает их концентрацию и соответственно химическую активность. Если концентрация этих компонентов раствора превышает предел их растворимости, то они выделяются из раствора в виде осадка. Указанная способность протеогликанов распространяется и на более сложные компоненты, в том числе на изолированные клетки, суспендированные в растворе. Протеогликаны, выгесняя из равномерной взвеси клетки в отдельную фазу, концентрируют их в предельно ограниченном объеме, что повышает активность наружной поверхности их мембран и способствует проявлению сил Ван-дер-Ваальса — Лондона, гидрофобным взаимодействиям, т. е. адгезии клеток, и препятствует их дисперсии [71—73].

Электровалентные взаимодействия протеогликанов с катионными группами белков и низкомолекулярных соединений (гистамин и другие биологически активные амины, лекарственные вещества и т. п.) могут приводить к образованию растворимых и нерастворимых соединений [74—78]. Электровалентные комплексы протеогликанов с белковыми веществами принимают участие в построении различных компонентов тканевых и клеточных структур. Связывание протеогликанами биологически активных аминов приводит к потере специфической активности тех и других. Весьма вероятно, что в основе механизма аккумуляирования ряда лекарственных веществ и антибиотиков резко выраженной основной природы лежит связывание их протеогликанами тканей [74]. То же можно утверждать и о механизме отложения в тканях, особенно в матриксе соединительной ткани, различных патологических продуктов [75]. Само собой разумеется, что в организме электровалентные взаимодействия и факторы стерического порядка являются взаимосвязанными.

Не рассматривая здесь проблему фибриллогенеза [79], транспорта воды и ионов в тканях, все же следует подчеркнуть, что протеогликаны имеют исключительно важное значение и в этих процессах, что отчасти очевидно из изложенного выше материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kennedy I. — *Biochem. Soc. Trans.*, 1973, v. 1, p. 809—813. — 2. Danishefsky H. et al. — *J. biol. Chem.*, 1969, v. 244, p. 1741—1745. — 3. Бычков С. М., Харламова В. Н. — *Бюлл. exper. биол.*, 1976, № 3, с. 289—291. — 4. Бычков С. М., Харламова В. Н. — Там же, 1975, № 2, с. 61—63. — 5. Höök M., Lidahl U., Iverins P. H. — *Biochem. J.*, v. 137, p. 33—40. — 6. Salva M. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 437, p. 129—191. — 7. Dietrich C. P., Nader H. B. — *Ibid.*, 1974, v. 343, p. 34—44. — 8. Harscall V., Riolo R. — *J. biol. Chem.*, 1972, v. 247, p. 4529—4538. — 9. Harino S., Meyer K. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1971, v. 44, p. 1371—1378. — 10. Kieras F. — *Biochem. J.*, 1974, v. 249, p. 7506—7513. — 11. Murata K., Hard T., Fujiwara T. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1971, v. 230, p. 583—591. — 12. Guss J. M., Hukins D. W., Smith P. J. et al. — *J. molec. Biol.*, 1975, v. 95, p. 359—384. — 13. Arpott S. — *Fed. Proc.*, 1977, v. 36, p. 73—78. — 14. Бычков С. М., Колесникова М. Ф. — *Биохимия*, 1969, т. 34, с. 204—208. — 15. Heinegard D. — *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 285, p. 193—201. — 16. Harwood J., Robinson H. — *Biochem. J.*, 1974, v. 141, p. 57—65. — 17. Бычков С. М., Харламова В. Н. — *Биохимия*, 1968, т. 33, с. 840—846. — 18. Seno W., Meyer K., Anderson B. et al. — *J. biol. Chem.*, 1965, v. 240, p. 1005—1015. — 19. Harsall V., Oegema F., Brown M. et al. — *Ibid.*, 1976, v. 251, p. 3511—3522. — 20. Horwood J., Robinson H. — *Biochem. J.*, 1974, v. 141, p. 57—62. — 21. Rosenber L., Wollenstein-Todel G., Morgolis K. et al. — *J. biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 6439—6444. — 22. Harsall V. C., Sajdera S. W. — *Ibid.*, 1969, v. 244, p. 2384—2396. — 23. Franc M., Dustone J. — *Ibid.*, 1969, v. 244, p. 3654—3659. — 24. Hardingham T. E., Muir H. — *Biochem. J.*, 1973, v. 135, p. 905—908. — 25. Hardingham T., Muir H. — *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 279, p. 401—409. — 26. Hardingham T., Muir H. — *Biochem. J.*, 1974, v. 139, p. 565—581. — 27. Hardingham T., Muir H. — *Biochem. Soc. Trans.*, 1973, v. 1, p. 282—284. — 28. Hardingham T., Muir H. — *Biochem. J.*, 1973, v. 135, p. 905—908. — 29. Harsall V.,

Heinegard D. — J. biol. Chem., 1974, v. 249, p. 4232—4241. — 30. Hardingham T., Muir H. — Biochem. J., 1974, v. 139, p. 565—572. — 31. Gregory J. — Ibid., 1973, v. 133, p. 383—386. — 32. Hardingham T. — In: Methodology of Connective Tissue Research. Oxford, 1976, p. 153—166. — 33. Roghley P. J., Mason R. M. — Biochem. J., 1976, v. 157, p. 357—367. — 34. Rosenber L., Hellman W., Kleinschmidt K. — J. biol. Chem., 1975, v. 250, p. 1877—1883. — 35. Swann D. A., Powell S., Braadhurst J. et al. — Biochem. J., 1976, v. 157, p. 503—506. — 36. Murat K., Bjella A. — J. Biochem. (Tokyo), 1976, v. 80, p. 203—209. — 37. Ruggei D., Dell'orb C., Ornacc D. — Histochem. J., 1977, v. 9, p. 249—252. — 38. Thyberg J. — Ibid., p. 259—266. — 39. Brandt K. D., Palmoski M. — Biochem. J., 1974, v. 143, p. 475—478. — 40. Muir H., Baxter E., Brandt K. — Biochem. Soc. Trans., 1972, v. 1, p. 37—46. — 41. Trigans C., Hardingham T., Muir H. — Biochim. biophys. Acta, 1971, v. 229, p. 529—534. — 42. Keiser H. — Arch. Biochem., 1975, v. 168, p. 622—629. — 43. Stulsatz H., Kisters R., Wallmer A. et al. — In: Connective Tissue. Eds. P. Fricke, E. Hartmann. Berlin, 1974, c. 37—49. — 44. Allen W. S., Otterbein E. C., Ward A. H. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 498, p. 167—172. — 45. Stevens R. L., Colombo M., Ganzaes J. J. et al. — J. clin. invest., 1976, v. 58, p. 470—481. — 46. Sweet M. B., Thonor E. J., Immelman A. R. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 437, p. 71—86. — 47. Oegema Th. R. — J. biol. Chem., 1977, v. 252, p. 6470—6477. — 48. Brandt D. — Arthr. a. Rheum., 1976, v. 19, p. 1308—1314. — 49. Adams P., Muir H. — Ann. rheum. Dis., 1976, v. 35, p. 289—296. — 50. Jhosh P., Taylor T., Brandt K. — Gerontology, 1977, v. 23, p. 87—113. — 51. Perricone E., Palmoski M. I., Brandt K. D. — Arthr. a. Rheum., 1977, v. 20, p. 1373—1380. — 52. Tsiganos C. P., Muir H. — In: Connective Tissue and Age. Ed. H. G. Vogel. Amsterdam, 1973, p. 132—137. — 53. Brandt K. D., Palmoski M. — Arthr. a. Rheum., 1976, v. 19, p. 209—215. — 54. Horsall V. C., Oegema F. R., Rrown M. et al. — J. biol. Chem., 1976, v. 251, p. 3511—3519. — 55. Buonassisi V., Root M. — Biochim. biophys. Acta, 1975, v. 385, p. 1—10. — 56. Schwartz N. B., Ho-Rei-Lee, Dorfman A. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, v. 71, p. 851—856. — 57. Schwartz W. B. — J. biol. Chem., 1977, v. 252, p. 6316—6321. — 58. Dohdi P., Muir H. — Biochem. J., 1976, v. 160, p. 117—120. — 59. Vogel K. G., Kelley R. O. — J. Cell. Physiol., 1977, v. 92, 469—480. — 60. Kramer P. M. — Biochemistry (Wash.), 1971, v. 10, p. 1445—1452. — 61. Kramer P. M. — Ibid., p. 1437—1445. — 62. Jamato K., Terayama H. — Cancer Res., 1973, v. 33, p. 2257—2264. — 63. Bhavanadon V. P., Davidson E. A. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 2032—2036. — 64. Kijoshi Furukawa, Hiroshi Terayama — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 499, p. 278—289. — 65. Бычков С. М., Збарский И. Б., Хазанова А. И. и др. Докл. АН СССР, 1951, т. 78, с. 99—101. — 66. Dietrich C. P., Sampalo L. O., Toledo O. M. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, v. 71, p. 1—10. — 67. Toledo M. S., Dietrich C. P. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 498, p. 114—122. — 68. Sampalo L. O., Dietrich C. P., Filho O. G. — Ibid., p. 123—131. — 69. Wasterson A., Wesermore B., Lindahl U. et al. — Int. J. Cancer, 1973, v. 12, p. 169—177. — 70. Wiebkin O. W., Muir H. — J. Cell. Sci., 1977, v. 27, p. 199—211. — 71. Бычков С. М., Кузьмина С. А. — Бюлл. exper. биол., 1973, № 6, с. 40—42. — 72. Бычков С. М., Кузьмина С. А. — Там же, 1977, № 3, с. 284—288. — 73. Бычков С. М., Кузьмина С. А. — Там же, № 11, с. 562—565. — 74. Scott J. E. — Biochem. Soc. Trans., 1973, v. 1, p. 787—806. — 75. Захарова М. М., Бычков С. М. — Бюлл. exper. биол., 1976, № 12, с. 1430—1432. — 76. Бычков С. М., Харламова В. Н. — Вopr. мед. химии, 1972, № 3, с. 269—275. — 77. Laurent T. C. — Fed. Proc., 1977, v. 36, p. 24—27. — 78. Бычков С. М., Хазанова А. И. — Вopr. мед. химии, 1967, № 5, с. 491. — 79. Мазуров В. И. Биохимия коллагеновых белков. М., 1974.

Поступила 9/VI 1978 г

MODERN DATA ON GLYCOSE AMINOGLYCANS AND PROTEOGLYCANS

S. M. Bychkov, M. M. Zakharova

Research Laboratory, Ministry of Public Health of the USSR, Institute of Rheumatism, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

The most important investigations on glyucose aminoglycans and proteoglycans, carried out within the recent 5-7 years, are reviewed. Data on primary structures repeating in glyucose aminoglycans and on relationship between these biopolymers and protein components in proteoglycans are considered. Newer information on conformational characteristics of glyucose aminoglycans, various complexes, aggregation of proteoglycans and distribution of the biopolymers in animal tissues and cells is discussed. Properties of proteoglycans in various solutions are briefly considered.

Ю. И. Барашнев, А. Н. Семлякина

СОСТОЯНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ГОМОЦИСТИНУРИИ

Отдел клинической генетики Московского научно-исследовательского института педиатрии и детской хирургии Министерства здравоохранения РСФСР

Описаны наблюдения за детьми с гомоцистинурией. Особое внимание обращено на нарушение опорно-двигательного аппарата. Изучение содержания оксипролина и кислых гликозаминогликанов (ГАГ) в моче обнаружило участие соединительной ткани в патологическом процессе. Отмечено повышение экскреции оксипролина и кислых ГАГ. Определение фракционного состава кислых ГАГ позволило выявить различия между изменениями, свойственными гомоцистинурии и болезни Марфана. Обсуждаются возможные гипотезы вовлечения соединительной ткани в патологический процесс при гомоцистинурии.

Гомоцистинурия относится к наследственным заболеваниям аминокислотного обмена, в основе которого лежит врожденная недостаточность фермента цистатионинсинтетазы [1]. Уточнение истинного генеза этого заболевания позволило не только выделить его из большой группы недифференцированных видов патологии, сопровождающихся грубыми и необратимыми повреждениями жизненно важных органов и систем, но и предложить реальные пути ранней диагностики и эффективной, патогенетически оправданной терапии [1—4].

Однако многие аспекты этой наследственной патологии обмена веществ до сих пор остаются малоизученными, что не позволяет объяснить генез целого ряда расстройств при гомоцистинурии. Это относится к установлению причин вовлечения в патологический процесс центральной нервной системы (ЦНС), органа зрения, опорно-двигательного аппарата, свертывающей системы крови [5—7]. Особого внимания, на наш взгляд, заслуживают нарушения обмена соединительной ткани, которые в клинической картине заболевания занимают ведущее место. В настоящем сообщении приводятся клинические и лабораторные данные о состоянии соединительной ткани при гомоцистинурии. Под нашим наблюдением находилось 4 больных в возрасте 2, 5, 7, 8 и 9 лет.

М е т о д ы и с с л е д о в а н и я

При оценке состояния опорно-двигательного аппарата и костной системы проводились не только учет и определение степени выраженности отдельных симптомов, но и предпринималась попытка объективной оценки характера изменений обмена соединительной ткани. С этой целью изучалась почечная экскреция оксипролина [8, 9] и кислых ГАГ [10, 11]. Фракционирование ГАГ осуществляли методом колоночной хроматографии на ионообменной смоле «Дауэкс» 1—2, 200—400 меш хлоридная форма [12].

Для идентификации отдельных фракций использовали стандарты гиалуроновой кислоты (РЕАХИМ), гепарансульфата (Sigma), хондроитинсульфатов (фирма «Koch-Light»). Полученные после фракционирования элюаты подвергали анализу на содержание урановых кислот карбазоловым и орциноловым методами [13].

Принимая во внимание необходимость дифференциации болезни Марфана от наследственного нарушения обмена метионина — гомоцистинурии, изучали показатели аминокислотного обмена. Хроматографию сыворотки крови и мочи осуществляли на ионообменных смолах (автоматический анализатор фирмы «Хитачи»). Данные о содержании аминокислот в норме получены на основании собственных исследований, проведенных на 25 здоровых детях в возрасте от 1 года до 15 лет.

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

Значительная часть симптомов гомоцистинурии свидетельствует об аномалиях опорно-двигательного аппарата, изменении зрения (подвывих хрусталиков) и ЦНС. Заслуживает внимания тот факт, что многие обнаруживаемые скелетные аномалии и дефекты зрения сходны с аналогичными

нарушениями при таком наследственном заболевании соединительной ткани, как болезнь Марфана [14].

Метаболические расстройства, выявленные при обследовании больных детей, были характерны для гомоцистинурии (табл. 1) и выражались в повышении содержания метионина в крови и моче, появлении гомоцистина и

Т а б л и ц а 1

Содержание аминокислот в крови (мг/100 мл) и моче (мг/сут) у больных гомоцистинурией

Характер метаболических расстройств	Пробанды с гомоцистинурией			
	Толя Е., 2½ лет	Марина П., 7 лет	Ира Д., 8 лет	Наташа Е., 9 лет
Метионин:				
в крови (норма 0,4—1,0)	1,2	1,1	1,49	1,5
в моче (норма 2—7,0)	27,75	20,8	44,0	44,1
Гомоцистин:				
в крови (в норме отсутствует)	Следы	Следы	Следы	Следы
в моче (в норме отсутствует)	21,4	69,7	180,0	78,0
Дисульфиды гомоцистеина — цистеина:				
в крови (в норме отсутствуют)	Следы	Следы	Следы	Следы
в моче (в норме отсутствуют)	38,4	120,0	106,0	114,1
Цистин:				
в крови (норма 0,7)	Нет	Нет	Нет	Нет
в моче (норма 5,3)	»	»	»	»
Серин:				
в крови (норма 1,8—2,4)	1,6	1,9	2,0	1,7
в моче (норма 12—13,5)	9,7	13,8	52,0	15,5

Т а б л и ц а 2

Почечная экскреция оксипролина и кислых ГАГ при гомоцистинурии

Больной	Возраст, годы	Почечная экскреция, оксипролина, мг/сут	Почечная экскреция кислых ГАГ, мг/уроновых кислот в сутки
Толя Е.	2½	84,0 (норма 35,6±2,1)	2,5 (норма 2,6±0,23)
Марина П.	7	31,2 (норма 46,7±2,99)	10,4 (норма 4,54±0,22)
Ира Д.	8	59,7 (норма 69,3±2,8)	22,4 (норма 5,39±0,3)
Наташа Е.	9	123 (норма 76,9±3,1)	15,2 (норма 6,86±0,49)

Пр и м е ч а н и е. Нормы почечной экскреции оксипролина и кислых ГАГ даны по [18].

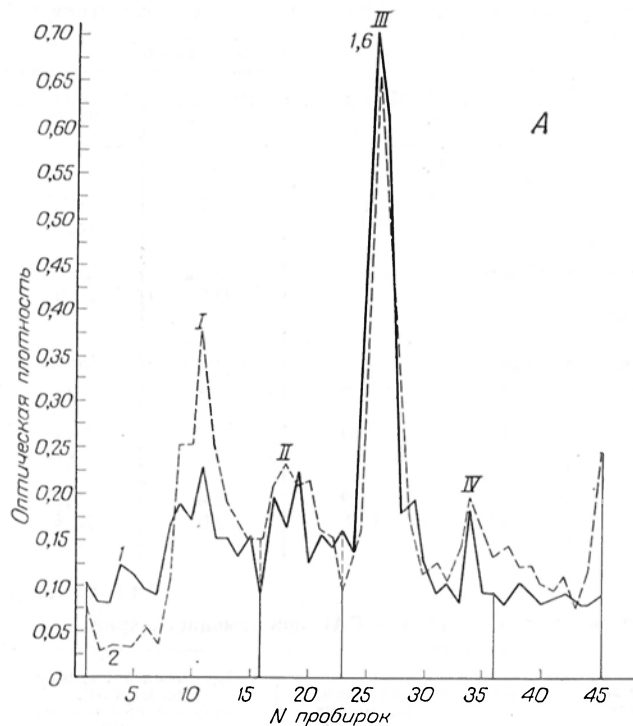
дисульфидов гомоцистеина — цистеина в сыворотке крови и моче и др. [4, 15—17].

Результаты изучения почечной экскреции оксипролина и кислых ГАГ представлены в табл. 2.

Из табл. 2 становится очевидным повышение экскреции оксипролина у 2 из 4 детей и кислых ГАГ у 3 больных гомоцистинурией. Обнаруженные изменения были сходны с данными обследования детей, страдающих болезнью Марфана [14], и могли свидетельствовать об изменении состояния основного вещества соединительной ткани и ее волокнистых структур (эластина и коллагена). Однако, определив фракционный состав кислых ГАГ, мы смогли выявить определенные различия между изменениями при гомоцистинурии и болезни Марфана (см. рисунок, А, Б). Наиболее ярко это проявлялось на примере карбазол-орцинолового показателя (при болезни Марфана $2,15 \pm 0,25$, а при гомоцистинурии $0,1 \pm 0,02$).

При обсуждении причин вовлечения соединительной ткани в патологический процесс высказывается предположение, что накопление гомоцисти-

на может оказывать тормозящее действие на превращение лизина в десмозины в процессе фибриллогенеза эластина [19]. Вероятным промежуточным продуктом в этой сложной реакции является δ -семиальдегид α -аминоадипиновой кислоты, образующейся в результате окислительного дезаминирования ϵ -аминогруппы лизина с помощью фермента типа аминоксидазы [20]. Допускается возможность взаимодействия сульфогруппы гомо-



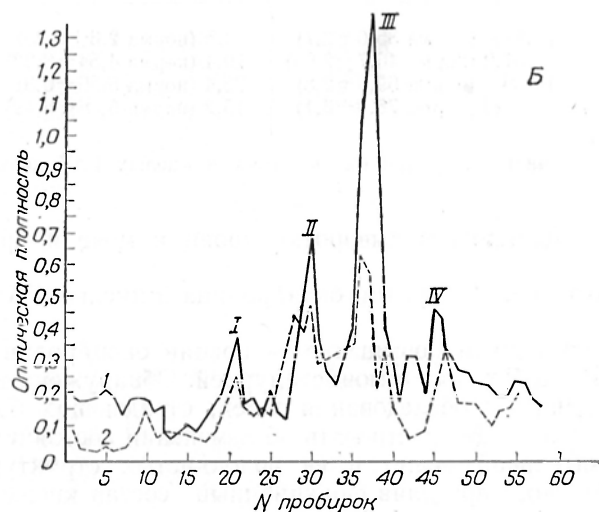
Хроматограмма кислых ГАГ мочи больного гомоцистинурией (А) и ребенка с болезнью Марфана (Б).

I — гиалуроновая кислота; II — гепарансульфат; III — хондроитинсульфаты А и С; IV — хондроитинсульфат В (дерматансульфат); 1 — карбазоловая, 2 — орциноловая реакции.

цистина с δ -семиальдегидом α -аминоадипиновой кислоты, вследствие чего нарушается нормальный биосинтез десмозина [21].

Кроме того, существует теория о патогенетическом влиянии гомоцистина на дефицит меди при гомоцистинурии. В этой связи определенный интерес могут иметь экспериментальные работы, свидетельствующие о резком снижении активности аминоксидазы в аорте и печени цыплят при дефиците меди в диете. Добавление препарата диаминооксидазы к тканевой культуре аорты цыпленка, имевшего недостаток меди в диете, стимулировало превращение лизина в десмозины [22].

В связи с этим предположением целесообразно обратить внимание на некоторое фенотипическое сходство гомоцистинурии с синдромом Менкеса (болезнью «курчавых во-



лос»). Показано [23] широкое вовлечение в патологический процесс костной и сосудистой систем у больных с этим генетически детерминированным страданием. Австралийские авторы смогли продемонстрировать, что при болезни «курчавых волос» в основе биохимической «поломки» лежит дефект кишечного всасывания меди, следствием чего является низкий уровень меди и церулоплазмينا в сыворотке крови больных.

Большой интерес представляет точка зрения [24] о стимулирующем влиянии гомоцистина на синтез сульфатированных ГАГ. Проведенное нами хроматографическое разделение кислых ГАГ мочи у больных с гомоцистинурией позволило обнаружить высокие концентрации в месте выхода хондроитинсульфатов А и С (см. рисунок, А). Известно, что хондроитинсульфаты А и С увеличивают скорость формирования тонких, незрелых коллагеновых волокон, замедляя рост волокон в толщину [25].

Превалирование «дерматаноподобных» фракций в хроматограммах ГАГ у больных гомоцистинурией, на наш взгляд, можно рассматривать как компенсаторную реакцию организма. Данную гипотезу можно считать достаточно обоснованной, если принять во внимание некоторую антикоагулянтную активность дерматансульфата [26] и результаты исследований [25], свидетельствующие о том, что хондроитинсульфат В благоприятствует росту волокон в толщину, способствуя тем самым организации тропоколлагена в волокна высшего порядка.

Таким образом, не вызывает сомнения, что при гомоцистинурии соединительная ткань вовлекается в патологический процесс, и происходящие при этом нарушения в значительной мере объясняют кардинальные клинические симптомы заболевания. Существующие гипотезы о генезе соединительнотканых расстройств заслуживают дальнейших углубленных разработок, так как определение истинных причин нарушений в обмене соединительной ткани позволит впоследствии усовершенствовать существующие методы терапии гомоцистинурии и предупреждать развитие тяжелых осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вельтищев Ю. Е., Барашнев Ю. И., Святкина О. Б. и др. — Педиатрия, 1972, № 3, с. 49—53. — 2. Вельтищев Ю. Е., Барашнев Ю. И. — Труды 2-го Московского мед. ин-та, 1976, т. 67, серия: Педиатрия, вып. 15, с. 35—39. — 3. Чичерин Л. П., Барашнев Ю. И., Абрисимова Н. А. и др. — Педиатрия, 1975, № 5, с. 40—46. — 4. Kottrower G. M., Lambert A. M., Cusworth D. C. et al. — Arch. Dis. Childh., 1966, v. 41, p. 666—671. — 5. Dunn H. G., Perry T. L., Dolman C. L. — Neurology, 1966, v. 16, p. 407—420. — 6. Кларр А. Genetische Stoffwechselstörungen. Jena, 1970, S. 85—88. — 7. McKusick V. A., Schimke R. N., Huang T. et al. — Circulation, 1965, v. 32, p. 149—150. — 8. Bergman J., Lexley R. — Analyt. Chem., 1963, v. 35, p. 1961. — 9. Дьячкова А. Я. — Лабор. дело, 1971, № 9, с. 532—534. — 10. Dische Z. — J. biol. Chem., 1947, v. 167, p. 189—198. — 11. Bitter T., Muir H. — Analyt. Biochem., 1962, v. 4, p. 330—334. — 12. Schiller S., Slover G., Dorfman A. — J. biol. Chem., 1961, v. 236, p. 983—987. — 13. Schultze H. E., Schmidtberger E., Haupt H. — Biochem. Z., 1958, Bd 329, S. 490—507. — 14. Семьячкина А. Н., Барашнев Ю. И. — Педиатрия, 1974, № 3, с. 58—63. — 15. Барашнев Ю. И., Святкина О. Б., Семьячкина А. Н. — Там же, 1976, № 6, с. 64—67. — 16. Carson N. A. J., Neill D. W. — Arch. Dis. Childh., 1962, v. 37, p. 505—513. — 17. Gerritsen T., Waisman H. A. — Pediatrics, 1964, v. 33, p. 413—420. — 18. Шамхалова В. Г. Значение показателей, характеризующих обмен соединительной ткани в комплексной оценке физического развития здоровых детей. Автореф. дис. канд. М., 1976. — 19. Perry T. L. — In: Heritable Disorders of Amino Acid Metabolism: Patterns of Clinical Expression and Genetic Variation. New York, 1974, p. 395—451. — 20. Partridge S. M., Davis H. F., Adair G. S. — Biochem. J., 1961, v. 79, p. 15. — 21. Pinnel S. R., Martin G. R., Miller F. J. — Science, 1968, v. 161, p. 475. — 22. Kim C. S., Hill C. H. — Biochem. biophys., 1966, v. 24, p. 395. — 23. Danks D. M., Stevens B. J., Campbell P. E. et al. — Lancet, 1972, v. 1, p. 1100. — 24. Schimke R. N., McKusick V. A., Huang T. et al. — J. A. M. A., 1965, v. 193, p. 711. — 25. Хрущов Н. Г. Гистогенез соединительной ткани. М., 1976. — 26. Плущик Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. М. — Л., 1969.

Department of Clinical Genetics, Institute of Pediatrics and Infant Surgery, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

Several patterns of connective tissue metabolism were studied in patients with homocystinuria. Contents of hydroxyproline and of glycosaminoglycans in urine were estimated. Genesis of the impairments in support-locomotive apparatus in the children is discussed.

УДК 616.37-008.931:577.152.341-097.5:616.153.1-074

В. В. Карпицкий, С. Я. Гуз

ВЛИЯНИЕ ПРЕЦИПИТИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПАНКРЕАТИЧЕСКОМУ КАЛЛИКРЕИНУ НА КОНТАКТНУЮ АКТИВАЦИЮ АРГИНИН-ЭСТЕРАЗЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И КРОЛИКА

Лаборатория биохимии научно-исследовательского института физических методов лечения и медицинской климатологии им. И. М. Сеченова, Ялта

Изучали влияние преципитирующих антител к панкреатическому калликреину свиньи на БАЭЭ-эстеразную активность плазмы крови человека и сыворотки крови кролика, активируемую каолином. Антитела оказывают ингибирующее действие на прирост БАЭЭ-эстеразной активности при обработке каолином на 1-й минуте инкубации. Ингибирование прироста БАЭЭ-эстеразной активности плазмы крови человека составило 65,1%, сыворотки крови кролика — 40,9%. Обсуждается возможный механизм ингибирования контактной активации аргинин-эстеразы крови человека и кролика антителами к панкреатическому калликреину.

Многочисленные данные литературы свидетельствуют о существенных различиях физико-химических свойств плазменных и тканевых калликреинов, в частности плазменных и панкреатического [1—4]. В то же время субстратная специфичность плазменного и панкреатического калликреинов узко ограничена расщеплением кининогена с образованием брадикинина. В предыдущих исследованиях в острых опытах было показано, что преципитирующие антитела к свиному панкреатическому калликреину подавляли кининогеназную активность плазменного калликреина [5—7]. Представляет интерес дальнейшее изучение возможного механизма этого эффекта в условиях влияния антител к панкреатическому калликреину на контактную активацию плазменного прекалликреина каолином.

Методы исследования

Использовали панкреатический калликреин свиньи (препарат «Дильминал», ВЭБ, ГДР), N-бензоил-L-аргинин этиловый эфир (БАЭЭ; «Реанал»). Антикалликреиновая преципитирующая сыворотка (АКС) была получена иммунизацией кроликов панкреатическим калликреином свиньи с полным адьювантом Фрейнда по следующей схеме: 0,5 мг препарата в 0,25 мл полного адьюванта Фрейнда трижды вводили подкожно с интервалом 3 дня, спустя 10 дней 1 мг препарата вводили внутримышечно без адьюванта. Через 10 дней производили забор крови. Пул АКС исследовали количественной преципитацией по Хайдельбергеру [8]. Зона эквивалентности АКС составила 120 мкг/мл, содержание белка антител — 310 мкг/мл. Перекрестных реакций с трипсином и химиотрипсином («Koch Light») в агаровом геле по Оухтерлони отмечено не было. Истощение АКС проводили панкреатическим калликреином свиньи в зоне эквивалентности в течение 5 дней. Истощенную АКС декантировали центрифугированием при 10 000 g, полноту истощения контролировали реакцией кольце-преципитации и иммунодиффузией по Оухтерлони. Нативную и истощенную АКС для инaktivации комплемента и других эстераз прогревали при 56°C в течение 1 ч. Влияние антител к панкреатическому калликреину на контактную активацию аргинин-эстеразы каолином в плазме крови человека исследовали по методу Колман [9] в модификации О. А. Гомазкова [10]: 0,3 мл плазмы крови человека инкубировали в полиэтиленовых пробирках с 0,1 мл нативной и истощенной АКС при 25°C в течение 20 мин, а затем определяли спонтанную эстеразную активность и БАЭЭ-эстераз-

ную активность, активируемую каолином, на 1, 5 и 30-й минутах. Изучение влияния преципитирующих антител к панкреатическому калликреину свиньи на контактную активацию аргинин-эстеразы сыворотки крови кролика проводили следующим образом: 7 кроликов иммунизировали панкреатическим калликреином свиньи по приведенной выше схеме. Забор крови производили в полиэтиленовые пробирки на холоду без антикоагулянтов. Пробы крови помещали на 12 ч в холодильник для образования сыворотки, которую затем исследовали методом Колман в модификации О. А. Гомазкова. В контрольной группе, состоящей из 7 кроликов, вводили только полный адьювант Фрейнда по аналогичной схеме. Было проведено исследование 4 интактных кроликов.

Результаты и обсуждение

Результаты опытов отражены в табл. 1 и 2. Спонтанная эстеразная активность плазмы крови человека при инкубации с нативной и истощенной АКС достоверно не различалась. БАЭЭ-эстеразная активность плазмы

Таблица 1

Влияние АКС на БАЭЭ-эстеразную активность плазмы крови человека при обработке каолином

Условия опыта	Спонтанная эстеразная активность	БАЭЭ-эстеразная активность, активируемая каолином		
		1-я минута	5-я минута	30-я минута
Инкубация плазмы крови с нативной АКС ($n=5$)	$27,6 \pm 4,6$	$37,8 \pm 6,1$	$24,3 \pm 4,4$	$10,0 \pm 10,2$
Инкубация плазмы крови с истощенной АКС ($n=5$) P	$23,7 \pm 5,1$ $<0,5$	$109 \pm 23,4$ $<0,02$	$40,2 \pm 15,6$ $<0,5$	$26,0 \pm 9,9$ $<0,5$

Примечание. Активность выражена в мкмоль гидролизованного БАЭЭ в 1 ч на 1 мл плазмы.

Таблица 2

Влияние иммунизации панкреатическим калликреином свиньи на БАЭЭ-эстеразную активность сыворотки крови кролика, активируемую каолином

№ п/п	Группа животных	Спонтанная эстеразная активность	БАЭЭ-эстеразная активность, активируемая каолином		
			1-я минута	5-я минута	30-я минута
1	Кролики иммунизированные панкреатическим калликреином ($n=7$)	$11,8 \pm 2,5$	$54,6 \pm 7,4$	$13,1 \pm 4,9$	$9,4 \pm 1,7$
2	Контрольные кролики — введение полного адьюванта ($n=7$)	$30,4 \pm 3,6$	$90,0 \pm 9,5$	$7,1 \pm 3,7$	$0,6 \pm 0,6$
3	Интактные кролики ($n=4$) P_{1-2} P_{1-3}	$15,4 \pm 5,0$ $<0,001$ $<0,5$	$91,9 \pm 13,8$ $<0,02$ $<0,05$	$11,6 \pm 3,6$ $<0,5$ $<0,5$	$9,7 \pm 5,3$ $<0,001$ $<0,5$

Примечание. Активность выражена в мкмоль гидролизованного БАЭЭ в 1 ч на 1 мл сыворотки крови.

крови человека, активируемая каолином на 1-й минуте, при инкубации с нативной АКС была на 65,1% ниже ($P<0,02$), чем при инкубации с истощенной АКС. БАЭЭ-эстеразная активность на 5-й и 30-й минутах при инкубации плазмы крови человека с нативной и истощенной АКС достоверно не различалась. Иммунизация кроликов панкреатическим калликреином свиньи сопровождалась достоверным снижением БАЭЭ-эстеразной активности сыворотки крови, активируемой каолином, на 1-й минуте на 39,3% по сравнению с контрольной группой ($P<0,02$) и на 40,6% по сравнению с интакт-

ными кроликами ($P < 0,05$). В контрольной группе при введении полного адьюванта Фрейнда наблюдалось достоверное повышение спонтанной эстеразной активности ($P < 0,001$) и снижение БАЭЭ-эстеразной активности на 30-й минуте ($P < 0,001$).

Таким образом, преципитирующие антитела к панкреатическому калликреину свиньи ингибируют прирост БАЭЭ-эстеразной активности при обработке плазмы крови человека и сыворотки крови кролика каолином на 1-й минуте инкубации. Согласно данным ряда авторов [1, 9, 11—13], прирост аргинин-эстеразной активности при обработке плазмы крови каолином на 1-й минуте инкубации обусловлен активацией плазменного прекалликреина. Следовательно, ингибирующий эффект антител к панкреатическому калликреину свиньи на прирост аргинин-эстеразной активности при обработке плазмы крови каолином может быть объяснен их влиянием на аргинин-эстеразную активность плазменного калликреина вследствие близкой иммунологической специфичности. Однако это предположение противоречит сложившимся представлениям о различной иммунологической специфичности плазменных и тканевых калликреинов, тем более что по ряду физико-химических свойств они также различаются. Следует отметить, что систематических исследований иммунологической специфичности плазменных и тканевых калликреинов не проводилось. Единичные работы с использованием частично очищенных препаратов не выявили выраженных перекрестных реакций [4, 14]. По всей видимости, различия полученных нами данных и литературных обусловлены, тем, что авторы использовали для иммунизации и проведения экспериментов препараты плазменного калликреина, у которого антигенные детерминанты были экранированы другими белками, тесно взаимодействующими в плазме крови с калликреином и трудно удаляемыми в процессе очистки, что могло привести к модификации антигенных свойств плазменного калликреина по сравнению с панкреатическим. Возможно, что в ранних [5—7, 15] и настоящих опытах создавались условия кратковременного существования дезэкранированной молекулы плазменного калликреина с иммунологической специфичностью, близкой к панкреатическому калликреину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Н. Киининовая система. Киев, 1977, с. 24—38.
2. Пасхина Т. С. — В кн.: Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов. М., 1969, с. 317—359.
3. Пасхина Т. С. — В кн.: Молекулярные основы патологии. М., 1966, с. 123—178.
4. Набергтапп Е., Klett W. — Biochem. Z., 1966, Bd 346, S. 133—158.
5. Проценко В. А., Карпицкий В. В., Богадельников И. В. — Пат. физиол., 1976, № 4, с. 76—78.
6. Карпицкий В. В. Использование специфических антител в исследовании ферментов протеолиза и их ингибиторов в организме. Дис. канд. Симферополь, 1975.
7. Проценко В. А., Шпак С. И., Богадельников И. В. и др. — В кн.: Использование лабораторных животных в разработке, производстве и контроле биологических медицинских препаратов. М., 1976, с. 177—178.
8. Иммунохимический анализ. Под ред. Л. А. Зильбера. М., 1968, с. 43—53.
9. Colman R. W., Mattler L., Sherry S. — J. clin. Invest., 1969, v. 48, p. 23—32.
10. Гомазков О. А., Комиссарова Н. В., Большакова Л. В. и др. — Кардиология, 1972, № 6, с. 25—31.
11. Веремієнко К. М., Волохоньська Л. І., Кизим О. Й. и др. — Укр. біохім. ж., 1974, № 2, с. 246—251.
12. Комиссарова Н. В., Гомазков О. А. — Бюлл. exper. биол., 1974, № 2, с. 35—38.
13. Girey G. J. D., Talano R. S., Colman R. W. — J. Lab. clin. Med., 1972, v. 80, p. 496—505.
14. Набергтапп Е. — Ann. N. I. Acad. Sci., 1963, v. 104, p. 130—132.
15. Богадельников И. В., Проценко В. А., Бычковский В. Н. и др. — Пат. физиол., 1976, № 5, с. 61—63.

Поступила 17/1 1978 г.

EFFECT OF THE PRECIPITATING ANTIBODIES AGAINST PANCREATIC KALLIKREIN ON THE CONTACT ACTIVATION OF ARGININE ESTERASE IN HUMAN AND RABBIT BLOOD

V. V. Karpinsky, S. Ya. Guz

Laboratory of Biochemistry, I. M. Sechenov Institute of Physical Methods of Treatment and of Medical Climatology, Yalta

Effect of precipitating antibodies against pig pancreatic kallikrein on the BAEE-esterase activity was studied in human blood plasma and in rabbit blood serum, activated by kaolin. An inhibitory effect of the antibodies on the increased BAEE-esterase activity was observed within the first minute of incubation after treatment with kaolin. The inhibition of the BAEE-esterase activity constituted 65.1% in human blood plasma and 40.9% in rabbit blood serum. Possible mechanism is discussed on the inhibition of contact activation of arginine esterase in human and rabbit blood by antibodies against pancreatic kallikrein.

УДК 616-008.931:577.152.111]-074

Л. К. Конюхова, В. Н. Малахов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ α -КЕТОБУТИРАТА
ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТЕЙ
СУБЪЕДИНИЦ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Четвертое главное управление при Министерстве здравоохранения СССР, Москва

Исследована возможность использования различных изоферментов ЛДГ человека в способности катализировать реакцию восстановления α -кетобутирата для количественного определения активности двух видов субъединиц этих изоферментов. Показано, что дифференциальные активности субъединиц изоферментов ЛДГ можно рассчитать, зная общие активности анализируемой пробы, измеренные отдельно с пируватом и α -кетобутиратом. Возможность такого метода продемонстрированы при анализе эталонных смесей изоферментов ЛДГ, а также образцов сыворотки крови здоровых людей и больных с характерными изменениями изоферментного спектра ЛДГ. Определение активности субъединиц изоферментов ЛДГ с использованием α -кетобутирата является простым, быстрым и экономичным методом оценки изоферментных профилей ЛДГ в физиологических жидкостях.

Определение изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) нашло широкое применение как в клинической практике, так и в экспериментальных исследованиях. Наиболее распространенным видом анализа изоферментов в настоящее время является определение их активности после предварительного разделения электрофорезом. Вследствие ряда серьезных недостатков, присущих такому способу анализа (сложность, трудоемкость, недостаточная точность и чувствительность), предпринимаются попытки создания неэлектрофоретических методов определения изоферментов. В частности, нами был разработан и исследован ряд кинетических и иммунохимических методов количественного определения изоферментов [1—5]. Было показано, что одним из возможных способов кинетического анализа профилей олигомерных изоферментов является дифференциальное определение активностей их субъединиц. Такие методы разработаны ранее нами и другими авторами для изоферментов ЛДГ на основе различий этих изоферментов в отношении субстратного ингибирования [1, 3, 6, 7] и способности взаимодействовать с аналогами НАД [8, 9].

В настоящей работе исследована возможность количественного дифференцирования активностей субъединиц изоферментов ЛДГ путем использования различий их каталитической активности в реакции восстановления α -кетобутирата. Определение α -кетобутиратдегидрогеназной активности в настоящее время применяется в лабораторной диагностике для косвенной оценки характера изоферментного профиля ЛДГ [10, 11]. Возможность его применения для количественного анализа разных типов субъединиц изоферментов ЛДГ ранее исследована не была.

Методы исследования

В работе использованы препараты изоферментов ЛДГ человека, полученные методом, описанным ранее [2]. Препараты каждого из 5 изоферментов ЛДГ хранили в виде суспензии в 3,2 М сульфате аммония при 4°C не более 6 мес. Перед использованием суспензию центрифугировали (6000 g, 40 мин, 5°C), надосадочную жидкость тщательно удаляли с осадка и стенок центрифужных пробирок. Осадок растворяли до нужных величин ферментативной активности в 0,1 М трис-солянокислом буфере, рН 7,4, содержащем сывороточный альбумин человека в концентрации 3%. Полученные растворы изоферментов ЛДГ хранили не более 8 ч.

Активность ЛДГ как с пируватом, так и с α -кетобутиратом определяли при 37°C по скорости убыли НАД·Н. Последнюю определяли на анализаторе скоростей реакций ЛКБ-8600 по снижению оптической плотности при 340 нм. 0,05 мл анализируемого образца смешивали в измерительной кювете с 1,0 мл раствора НАД·Н (динатриевая соль, реактив фирмы «Boehringer») в 0,1 М трис-солянокислом буфере, рН 7,4 и инкубировали при 37°C не менее 30 мин. Реакцию начинали добавлением 0,05 мл раствора пирувата натрия (реактив фирмы «Boehringer») или 0,05 мл раствора α -кетобутирата. Последний получали нейтрализацией α -кетомасляной кислоты (реактив фирмы «Merck») гидроокисью натрия. Конечная концентрация НАД·Н в реакционной смеси составляла 0,15 мМ [12]. Оптическую плотность регистрировали в течение 1 или 2,0 мин в зависимости от уровня определяемой активности. Результаты получали как среднее 3—5 измерений и выражали в международных единицах ферментативной активности (Е).

Кровь брали из локтевой вены натощак. Ферментативную активность определяли в сыворотках крови без гемолиза; сыворотки хранили при 4°C не более 1 сут.

Результаты и обсуждение

Принцип метода

Тетрамерные молекулы изоферментов ЛДГ имеют 4 активных центра — по одному на каждую из субъединиц [13, 14]. Можно предположить, что каталитические свойства субъединиц как вида Н, так и вида М одинаковы во всех «гибридных» тетрамерах H_3M , H_2M_2 и HM_3 и тождественны их свойствам в составе изоферментов H_4 и M_4 соответственно (гипотеза о внутримолекулярной каталитической независимости активных центров субъединиц в тетрамерных молекулах изоферментов ЛДГ) [7, 13, 14]. При таком предположении смеси 5 изоферментов ЛДГ можно формально рассматривать как соответствующие смеси субъединиц Н и М, абстрагируясь от их реальной упорядочности в тетрамерные структуры, и оперировать понятиями «активность субъединиц Н» и «активность субъединиц М».

Определив величины общей активности смеси изоферментов ЛДГ с пируватом (A_1) и α -кетобутиратом (A_2), можно отдельно рассчитать активности каждого из видов субъединиц, входящих в состав изоферментов анализируемой смеси. Действительно, в соответствии со сказанным выше:

$$A_1 = A_H + A_M$$

$$A_2 = A_H^1 + A_M^1,$$

где A_H и A_M — величины активностей субъединиц Н и М с пируватом, A_H^1 и A_M^1 — активности субъединиц с α -кетобутиратом. Обозначим A_H^1/A_H и A_M^1/A_M как k_H и k_M соответственно. Тогда

$$A_1 = A_H + A_M$$

$$A_2 = k_H A_H + k_M A_M,$$

откуда, если $k_H \neq k_M$

$$A_H = \frac{A_2 - k_M A_1}{k_H - k_M}, \quad (1)$$

$$A_M = A_1 - A_H. \quad (2)$$

Экспериментальная проверка метода

Таким образом, если значения величин k_H и k_M различны и предварительно определены, по измеряемым численным значениям общей активности смеси изоферментов ЛДГ с пируватом и α -кетобутиратом можно рассчитать величины активностей их субъединиц (A_H и A_M соответственно). Из выражений (1) и (2) видно, что погрешность определения величин A_H и A_M растет с уменьшением разницы $k_H - k_M$ (при постоянной погрешности определения A_1 и A_2). В табл. 1 приведены результаты определения величин k_H и k_M с использованием очищенных изоферментов H_4 и M_4 . Значения этих

Таблица 1

Значения величин k_H , k_M и их различия при разных концентрациях пирувата

Величина	Концентрация пирувата, мМ		
	1,2	1,6	3,0
k_H	0,51	0,50	0,55
k_M	0,17	0,18	0,14
$k_H - k_M$	0,34	0,32	0,41

Примечание. Концентрация α -кетобутирата в реакционной смеси составляла 3,0 мМ, изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-5—23 Е/л при концентрации пирувата 3,0 мМ.

величин, как и значения их разности, изменяются с изменением концентрации пирувата при фиксированной концентрации α -кетобутирата. Различие между величинами k_H и k_M было наибольшим при концентрации пирувата 3,0 мМ (при такой же концентрации α -кетобутирата) и составило 0,41 при значениях k_H и k_M 0,55 и 0,14 соответственно. Указанные концентрации пирувата и α -кетобутирата использовались далее при определении активностей субъединиц как стандартные. При этом расчет активностей субъединиц в соответствии с выражениями (1) и (2) производился следующим образом:

$$A_H = 2,44A_2 - 0,34A_1, \quad (3)$$

$$A_M = A_1 - A_H. \quad (4)$$

Исследование значений k_H и k_M при более высоких концентрациях пирувата не проводилось вследствие появлявшейся при таких концентрациях нелинейности кинетических кривых, делавшей невозможным корректный расчет начальной скорости ферментативной реакции.

Определенные значения величин k_H и k_M сохранялись в широком диапазоне концентраций изоферментов H_4 и M_4 — указанные величины существенно не изменялись при варьировании активности изоферментов от 0,5 до 30 Е в 1 л реакционной смеси. Повторяемость день ото дня значений k_H и k_M , измеренных 15 раз в течение 6 мес через разные промежутки времени, оказалась удовлетворительной: величины средних арифметических и стандартных отклонений составили соответственно 0,55 и 0,02 для k_H 0,13 и 0,01 для k_M .

На рис. 1 представлены результаты определения активностей субъединиц в индивидуальных изоферментах ЛДГ человека. Видно, что полученные соотношения величин A_H и A_M для каждого из изоферментов равны

Таблица 2

Значения величин k_H и k_M в присутствии компонентов сыворотки крови

№ сыворотки	Активность ЛДГ сыворотки с пируватом в концентрации 3,0 мМ, Е/л	k_H	k_M
1	256	0,55	0,15
2	277	0,55	0,11
3	292	0,53	0,10
4	224	0,56	0,12
5	243	0,58	0,13
6	284	0,52	0,15
7	265	0,56	0,10
8	315	0,53	0,17
9	296	0,54	0,16
	M	0,55	0,13
	σ	0,02	0,024

Примечание. M — среднее арифметическое, σ — среднее квадратическое отклонение. Активности очищенных изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-5 в реакционной среде составляли 14 и 17 Е/л соответственно (концентрация пирувата 3,0 мМ).

мольному соотношению их субъединиц. Из этого, очевидно, следует, что молекулярные активности субъединиц вида Н, находящиеся в разных тетрамерах ЛДГ, одинаковы, то же относится к субъединицам вида М; при концентрации пирувата 3,0 мМ молекулярная активность субъединиц Н близка к молекулярной активности субъединиц М. Эти выводы находятся в соответствии со сделанным выше предположением о внутримолекулярной каталитической независимости субъединиц в изоферментах ЛДГ.

Дальнейшее исследование возможности дифференцирования активностей субъединиц Н и М с использованием α -кетобутирата было проведено на эталонных смесях изоферментов ЛДГ (смеси очищенных изоферментов с из-

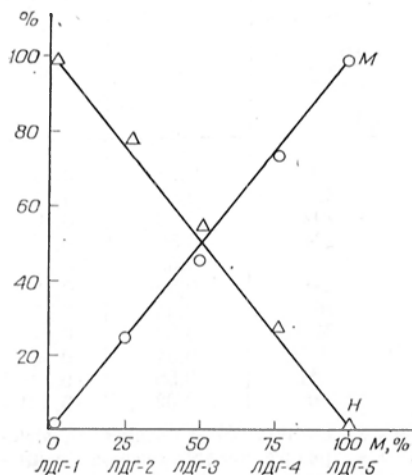


Рис. 1. Парциальные активности субъединиц Н и М в изоферментах ЛДГ человека. Активность изоферментов в реакционной смеси составляла 18 Е/л (концентрация пирувата — 3,0 мМ).

По оси абсцисс — доля субъединиц вида М в %; по оси ординат — активность субъединиц в % к общей.

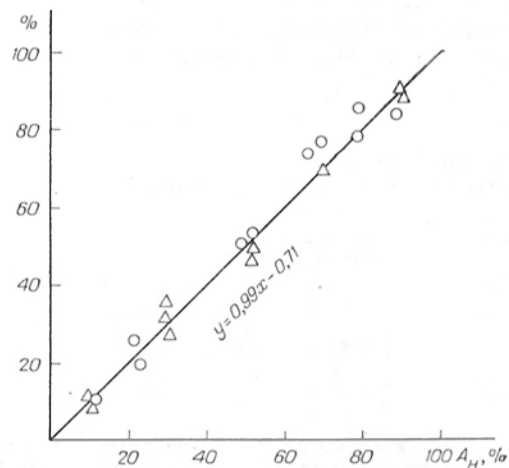


Рис. 2. Результаты определения активностей субъединиц в смесях изоферментов ЛДГ заданного состава.

Кружки — смеси изоферментов H_4 и M_4 ; треугольники — смеси из 5 изоферментов ЛДГ. Величины A_n для смесей изоферментов (заданные значения) рассчитаны по данным, приведенным на рис. 1. Общие активности смесей изоферментов составляли 18 ± 1 Е на 1,0 л реакционной смеси.

По оси абсцисс — заданные значения A_i в % от общей активности A_i ; по оси ординат — полученные значения A_n в % от общей активности A_i .

вестным содержанием каждого из них), а также некоторых образцов сыворотки крови человека.

Состав смесей варьировали в широком диапазоне количественных соотношений изоферментов, имитируя, в частности, их соотношения в крови здоровых людей, больных инфарктом миокарда, острым гепатитом и другими заболеваниями. Результаты определения активностей субъединиц в эталонных смесях приведены на рис. 2. Как видно, между заданными и полученными значениями активностей субъединиц наблюдается вполне удовлетворительное совпадение, коэффициент корреляции составляет 0,992.

Для того чтобы проводить определение субъединиц изоферментов ЛДГ в физиологических жидкостях человека, в частности в сыворотке крови, необходимо быть уверенным, что присутствие ее компонентов не изменяет используемые значения величин k_H и k_M . В табл. 2 приведены значения этих величин для изоферментов H_4 и M_4 , полученные поочередно в присутствии каждой из 9 сывороток крови, выбранных наугад из образцов, поступивших на биохимический анализ в клиническую лабораторию. Приведенные здесь результаты показывают, что присутствие компонентов сыворотки крови существенно не изменяет значения величин k_H и k_M , определенные с использованием очищенных изоферментов ЛДГ.

Результаты определения активностей субъединиц в сыворотке крови практически здоровых людей, больных инфарктом миокарда и острым вирусным гепатитом, приведены в табл. 3. Полученные данные в целом соответствуют изменениям соотношения сывороточных изоферментов ЛДГ, наблюдаемым при указанных заболеваниях. Так, значительное увеличение активности субъединиц вида Н у больных острым инфарктом миокарда соответствует увеличению кардиоспецифических изоферментов H_4 и частично H_3M , обнаруживаемого с использованием электрофореза [17—20]. Аналогичное заключение можно сделать в отношении возрастания активности субъединиц М у больных острым гепатитом, которое соответствует росту активности изоферментов M_4 и HM_3 [17, 18, 21—25].

Таким образом, определение двух величин ферментативной активности ЛДГ — с пируватом и α -кетобутиратом — позволяет количественно дифференцировать активности субъединиц изоферментов ЛДГ как в искусственных смесях последних, так и в сыворотке крови здоровых и больных людей.

Вероятно, не существует значительных препятствий для использования этого метода при анализе изоферментного профиля ЛДГ в других объектах — гомогенатах тканей, спинномозговой жидкости и т. д. Простота и быстрота измерения суммарной активности изоферментов ЛДГ (1—2 мин при использовании анализатора ЛКБ-8600) позволяют одному лаборанту исследовать до 100 образцов в течение рабочего дня.

Как уже отмечалось, ранее было предложено использовать измерение α -кетобутиратдегидрогеназной активности для косвенной оценки характера изоферментного профиля ЛДГ [10, 11]. Возможность такой оценки обусловлена значительными различиями в каталитической активности изоферментов ЛДГ в реакции восстановления α -кетобутирата — большая часть скорости последней определяется содержанием субъединиц вида Н. Простота и экономичность данного метода, а также возможность полной автоматизации измерения α -кетобутиратдегидрогеназной активности привели к значительному распространению этого вида анализа в биохимической диагностике.

Нами предлагается более совершенный способ характеристики изоферментного профиля ЛДГ с использованием α -кетобутирата — количественное и дифференциальное определение активностей субъединиц Н и М, составляющих тетрамерные молекулы изоферментов ЛДГ. Дифференциальное определение активностей субъединиц обладает существенными достоинствами — определяемые параметры имеют четкий физический смысл, количественно связаны с исходным профилем изоферментов исследуемого образца. Представляется несомненным, что использование их в диагностических целях даст более полную информацию, чем определение только α -кетобутиратдегидрогеназной активности.

Как настоящий метод, так и предложенные ранее методы определения отдельных видов субъединиц в смеси изоферментов ЛДГ основаны на измерении их суммарной активности в разных экспериментальных условиях. Выше указывалось, что в таких методах использовалось измерение активности ЛДГ при двух разных концентрациях субстрата — L (+) лактата [3, 7] или пирувата [1, 6], измерение активности с НАД и его структурны-

Таблица 3
Результаты определения активностей субъединиц изоферментов ЛДГ в сыворотке крови

Сыворотка	Число образцов	Активность субъединиц, Е/л ($M \pm m$)	
		Н	М
Норма	20	202 ± 28	100 ± 13
При крупноочаговом инфаркте миокарда (15—40 ч после приступа)	8	1800 ± 488	316 ± 71
При остром вирусном гепатите	11	345 ± 74	891 ± 268

ми аналогами [8]. По получаемым в выбранных условиях значениям суммарной активности изоферментов ЛДГ рассчитывались активности их субъединиц. При этом явно или неявно предполагалось, что свойства определяемых субъединиц тождественны во всех тетрамерах ЛДГ. Отличаясь некоторыми деталями, применяемые в этих методах схемы расчета близки по своей сути и аналогичны использованным в настоящей работе.

Недавно описан метод определения мольных соотношений субъединиц вида Н и субъединиц вида М, в котором наряду с различиями в субстратном ингибировании изоферментов ЛДГ использованы их различия по отношению к аналогам НАД [9]. Расчет величины мольных соотношений по аналитическим формулам заменен здесь нахождением их по калибровочному графику, построенному по 5 точкам. Значения ординат последних являются отношениями активностей 5 изоферментов ЛДГ с НАД и его аналогов к разным концентрациям L (+) лактата или α -оксибутирата; значения абсцисс — величинами мольных соотношений субъединиц в индивидуальных изоферментах ЛДГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мамаев В. Б., Малахов В. Н., Обухова Л. К. — *Вопр. мед. химии*, 1972, № 2, с. 161. — 2. Чазов Е. И., Малахов В. Н., Александрова В. А. и др. — *Кардиология*, 1972, № 11, с. 5. — 3. Губерниева Л. М., Сафронова Е. Е., Анненков Г. А. и др. — *Биохимия*, 1976, № 1, с. 153. — 4. Чазов Е. И., Малахов В. Н., Тищенко В. А. и др. — *Бюлл. exper. биол.*, 1976, т. 81, с. 659. — 5. Малахов В. Н., Тищенко В. А. — В кн.: *Науч. конф. 4-го Главного управления МЗ СССР. Тезисы докладов*. М., 1973, с. 133. — 6. Plagemann P. G. W. et al. — *J. biol. Chem.*, 1960, v. 235, p. 2288. — 7. Stambaugh R., Post D. — *Analyt. Biochem.*, 1966, v. 15, p. 470. — 8. Kaplan N. O., Sahn R. D. — *Biochemistry (Wash.)*, 1962, v. 1, p. 2123. — 9. Komoda T., Sakagishi Y., Mizushima H. — *Clin. chim. Acta*, 1976, v. 72, p. 285. — 10. Elliot B. A., Jepson E. M., Wilkinson J. H. — *Clin. Sci.*, 1962, v. 23, p. 305. — 11. Elliot B. A., Wilkinson J. H. — *Lancet*, 1962, v. 2, p. 71. — 12. Gay R. I., McComb R. V., Bowers G. N. — *Clin. Chem.*, 1968, v. 14, p. 470. — 13. Adams N. J., Ford G. S., Koekeek R. et al. — *Nature*, 1970, v. 227, p. 1098. — 14. Griffin J. H., Criddle R. S. — *Biochemistry (Wash.)*, 1970, v. 9, p. 1195. — 15. Rouslin W., Braswell E. — *J. Theoret. Biol.*, 1968, v. 19, p. 169. — 16. Сафронова Е. К., Губерниева Л. М., Малахов В. Н. — *Биохимия*, 1975, № 4, с. 739. — 17. Уилкинсон Дж. (Wilkinson J.) *Изоферменты*. М., 1968, с. 108—119. — 18. Latner A. L., Skilken A. W. *Isoenzymes in Biology and Medicine*. London, 1968, p. 4—42. — 19. Коровкин Б. Ф., Михалева Н. П., Черниенко И. С. — *Лабор. дело*, 1966, № 12, с. 702. — 20. Чазов Е. И., Смирнов В. Н., Зыско А. П. и др. — *Кардиология*, 1970, № 2, с. 5. — 21. Юрков Ю. А., Алатырцев В. В., Исмаилова М. Х. *Сов. мед.*, 1967, № 10, с. 42. — 22. Бакланова Т. А., Маркелов И. М. — *Тер. арх.*, 1968, № 4, с. 49. — 23. Rosalki S. B., Wilkinson J. H. — *Nature*, 1961, v. 188, p. 1110. — 24. Rosalki S. B., Wilkinson J. H. — *J. A. M. A.*, 1964, v. 189, p. 61. — 25. McQueen M. J., Gurland J. W. C., Morgan H. G. — *Clin. chim. Acta*, 1973, v. 43, p. 397.

Поступила 1/VI 1978 г.

USE OF α -KETOBUTYRATE FOR DIFFERENTIAL ESTIMATION OF ACTIVITY OF LACTATE DEHYDROGENASE ISOZYME SUBUNITS

L. K. Konyukhova, V. N. Malakhov

The Fourth Department, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Estimation of α -ketobutyrate dehydrogenase activity might be used for quantitative evaluation of LDH isozyme subunits H and M. Empiric constants, which are included in equations for calculation of the activity of subunits and applied for purified human LDH isoenzymes, were not altered in presence of blood serum and were quite reproducible from day to day. Reliability of quantitative differentiation of the activities of H and M subunits by means of α -ketobutyrate was demonstrated by analyses of standard LDH isoenzyme mixtures as well as of normal and pathological blood sera with typical patterns of LDH isoenzymes. Estimation of activity of the LDH isozyme subunits using α -ketobutyrate proved to be rapid, simple and unexpensive method for determination of LDH isoenzyme spectra in physiological fluids.

В. И. Нигуляну

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В НАДПОЧЕЧНИКАХ И ИХ ФУНКЦИЯ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Кафедра патологической физиологии Кишиневского медицинского института

В опытах на крысах и кроликах исследовали концентрацию кортикостерона, активность сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, содержание аскорбиновой кислоты, восстановленного глутатиона, свободных аминокислот, РНК, ДНК в надпочечниках через 10 мин, 5, 10 и 24 ч после раздавливания мягких тканей задних конечностей на фоне неизменной, а также повышенной предварительным введением АКТГ функции надпочечных желез. Установленные изменения концентрации кортикостерона и компонентов энергетического и белкового обмена в надпочечниках свидетельствуют о том, что при изучаемой патологии наступает стойкая их гиперфункция, обусловленная влиянием АКТГ.

Всестороннее изучение различных показателей функционирования гипофизарно-адреналовой системы привело к формированию определенных взглядов на механизмы продукции и утилизации кортикостероидных гормонов при травматическом шоке [1—3]. Как известно, при воздействии на организм различных экстремальных факторов надпочечники, изменяя свою секреторную функцию, способствуют включению механизмов, направленных на адаптацию к новым условиям существования [4]. В то же время мало изучены состояние синтеза кортикостероидных гормонов при действии на организм механической травмы, потенциальные возможности надпочечниковой гиперфункции и генез глюкокортикоидной недостаточности в этих условиях.

Для выяснения функциональной активности надпочечников и метаболического обеспечения синтеза кортикостероидов при тяжелой механической травме в настоящей работе изучали содержание в надпочечниках кортикостерона, аскорбиновой кислоты и глутатиона, свободных аминокислот, нуклеиновых кислот, активность сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы.

Методы исследования

Работа проведена на 160 половозрелых крысах самцах и 76 кроликах породы шиншилла. Механическую травму наносили раздавливанием мягких тканей задних конечностей тисками [5]. АКТГ вводили внутримышечно по 2 ЕД на 100 г массы за 2 ч до нанесения травмы. Активность сукцинатдегидрогеназы определяли тетразолиевым методом [6], результаты выражали в миллиграммах образовавшегося формазана на 1 г сырой ткани. Активность цитохромоксидазы определяли описанным ранее методом [7] и выражали в миллиграммах индофенола на 1 г сырой ткани. Для определения глутатиона был использован нитропруссидный метод [8], а для определения аскорбиновой кислоты — метод, описанный ранее [9]. Свободные аминокислоты определяли описанным ранее методом [10] в модификации [11]. Количество нуклеиновых кислот исследовали спектрофотометрически [12], а содержание кортикостерона определяли спектрофлуорометрическим методом [13].

Результаты и обсуждение

Через 10 мин после нанесения травмы в надпочечниках достоверно повышается содержание кортикостерона (рис. 1) и восстановленного глутатиона (рис. 2) при одновременном снижении концентрации аскорбиновой кислоты (см. рис. 2). Сходные закономерности были установлены и через 5 ч после раздавливания (см. рис. 1, 2).

Более длительная травматизация (10 ч) приводила к снижению концентрации кортикостерона в ткани надпочечников по сравнению с таковой в предыдущие сроки исследования. При этом количество аскорбиновой кислоты было ниже ($P < 0,01$), а глутатиона выше исходных величин, что

указывает на высокую функциональную активность надпочечников в этот период. Возможно, что снижение содержания кортикостерона в них обусловлено резкой стимуляцией его секреции.

К исходу 24-го часа после травмы содержание кортикостерона в ткани надпочечника значительно возросло (см. рис. 1) по сравнению с концент-

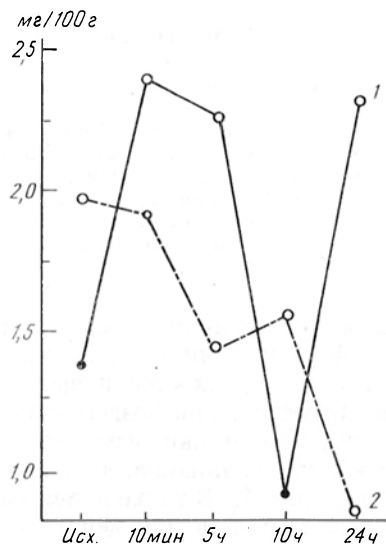


Рис. 1. Изменения концентрации кортикостерона в надпочечниках крыс при травме.

По оси абсцисс — время после травмы. 1 — при неизменной исходной функции надпочечников; 2 — при предварительном введении АКТГ.

Светлым кружочком обозначены изменения достоверные по сравнению с исходными.

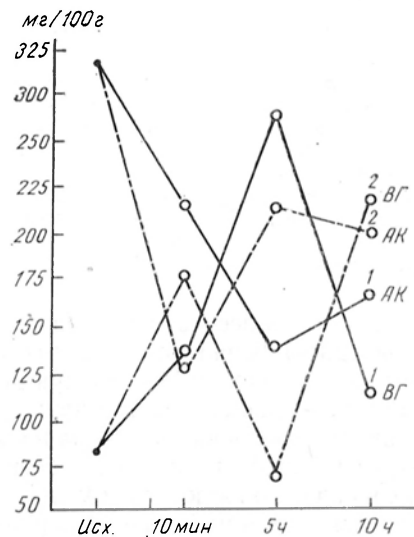


Рис. 2. Изменения концентрации аскорбиновой кислоты (АК) и восстановленного глутатиона (ВГ) в надпочечниках крыс при травме.

Обозначения, как на рис. 1.

Содержание свободных аминокислот (в мг на 100 г массы) в надпочечниках крыс в различные сроки после травмы

Аминокислота	Время после нанесения травмы				
	до травмы	10 мин	5 ч	10 ч	24 ч
Цистин	41,0±2,28	30,4±1,41*	18,5±1,75*	82,8±8,87*	37,8±4,38
Лизин	25,7±3,28	20,8±2,04	22,9±2,55	48,1±1,05*	18,4±1,63
Гистидин	22,1±2,13	21,7±1,65	39,6±3,10*	43,3±4,60*	29,3±2,65*
Аргинин	18,4±1,25	19,5±2,08	20,4±1,80	44,8±4,85	33,5±2,40*
Аспарагиновая кислота + серин	21,9±3,11	19,7±1,83	54,6±3,02*	119±7,21*	45,6±4,99*
Глицин	31,6±1,52	23,0±1,46*	36,9±3,27	40,5±2,32	32,5±2,14
Глутаминовая кислота + треонин	32,7±3,03	33,7±9,94	77,0±3,67*	80,0±3,98*	59,7±3,51*
Аланин	30,1±1,97	31,9±2,59	22,6±4,23	53,2±4,50*	36,2±2,47
Тирозин	8,58±0,79	14,5±3,29	12,9±1,55*	59,7±5,42*	13,7±1,30*
Триптофан	9,68±0,85	13,0±1,51*	14,6±1,30*	50,2±4,08*	40,4±2,81*
Метонин + валин	14,1±1,12	38,1±2,35*	27,4±2,04*	54,0±2,64*	36,0±3,32*
Фенилаланин	10,2±1,06	28,5±3,51*	46,2±6,70*	44,7±2,68*	17,1±1,90*

Примечание. В каждой серии было по 10 животных.

* Изменения, достоверные по сравнению с исходным уровнем до травмы.

рацией как отмеченной через 10 ч, так и исходной. Количество аскорбиновой кислоты и глутатиона было достоверно ниже исходных величин.

Сдавление мягких тканей задних конечностей у кроликов приводило к повышению активности цитохромоксидазы в надпочечниках как через 10 мин ($P < 0,05$), так и через 5 ч ($P > 0,05$) после начала травматизации.

На активность сукцинатдегидрогеназы травма существенного влияния не оказывала (рис. 3).

Результаты исследований также показали, что под влиянием механической травмы общий фонд свободных аминокислот надпочечников достоверно увеличивается во все сроки исследования. Так, уже через 10 мин после начала воздействия нарастала концентрация тирозина, триптофана, метионина и фенилаланина. К 5-му часу наряду с перечисленными аминокислотами наблюдалось повышение содержания гистидина, аспарагиновой кислоты с серином и глутаминовой кислоты с треонином. Спустя 10 ч от начала раздавливания существенно выше исходной была концентрация всех исследуемых свободных аминокислот (см. таблицу).

К 24-му часу после нанесения травмы в надпочечниках сохранялась высокая концентрация многих свободных аминокислот, за исключением цистина, лизина, глицина и аланина.

Через 5 ч после начала травматизации количество РНК и ДНК в надпочечниках было выше исходных величин (рис. 4), а через 10 ч существенно выше, чем через 5 ч.

Введение кроликам АКГТ приводит через 2 ч к резкому увеличению в надпочечниках содержания кортикостерона, РНК и ДНК, общего фонда свободных аминокислот, в основном за счет накопления лизина, тирозина и триптофана, а также к активации сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы (через 30 и 60 мин после введения).

Предварительное введение АКГТ крысам и кроликам изменяло характер метаболической реакции надпочечников на травматическое воздействие. Под влиянием механической травмы у крыс, предварительно получивших АКГТ, не происходит накопление гормона в железе (см. рис. 1). Наоборот, концентрация кортикостерона была существенно ниже исходного уровня

Рис. 4. Изменения содержания РНК и ДНК в надпочечниках крыс при травме. Обозначения, как на рис. 1.

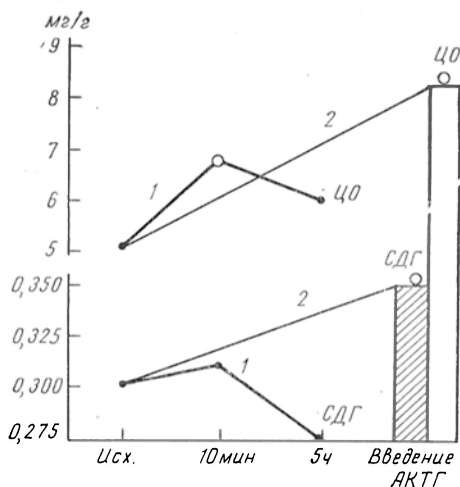
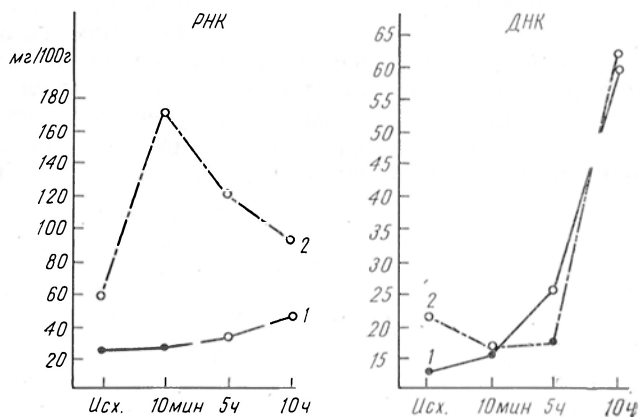


Рис. 3. Изменения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитохромоксидазы (ЦО) в надпочечниках кроликов при травме (1) и введения АКГТ (2). Обозначения, как на рис. 1.

через 5, 10 и 24 ч после начала раздавливания. Необходимо отметить, что концентрация аскорбиновой кислоты в надпочечниках у этих животных снижалась как через 10 мин, так и через 5 и 10 ч после травмы, тогда как характер изменений содержания восстановленного глутатиона через 5 ч был противоположным: у животных, не получивших АКГТ, его

содержание достоверно повышалось, а на фоне АКТГ достоверно снижалось (см. рис. 2).

Компрессия задних конечностей у кроликов с искусственной гиперфункцией надпочечников не приводила к существенным изменениям в них общего фонда свободных аминокислот (рис. 5), тогда как концентрация отдельных аминокислот значительно изменялась. Так, через 10 мин отмечалось повышение количества гистидина ($P < 0,05$) и снижение содержания триптофана ($P < 0,05$), а через 5 ч — снижение уровня цистина ($P < 0,05$) и триптофана ($P < 0,05$).

Предварительная стимуляция гипофизарно-адреналовой системы изменяла также характер и интенсивность реагирования нуклеиновых кислот надпочечников на последующее механическое воздействие. Уже на 10-й минуте после начала раздавливания кон-

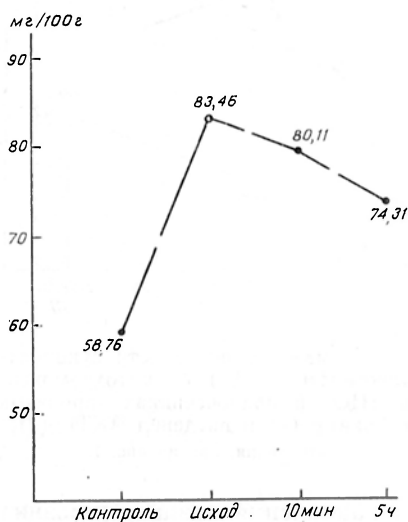


Рис. 5. Изменения общего фонда свободных аминокислот надпочечников у кроликов при раздавливании мягких тканей на фоне предварительного введения АКТГ.

Обозначения, как на рис. 1.

посылкой дополнительного синтеза ферментов стероидогенеза и поддержания длительной гормональной активности желез.

Результаты исследований, полученные в опытах с введением АКТГ, свидетельствуют об определенной идентификации изменений метаболизма надпочечников при этих двух видах воздействия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Еремина С. А. — Бюлл. exper. биол., 1969, № 6, с. 40. — 2. Ельский В. Н. — Там же, 1974, № 5, с. 17. — 3. Зорькин А. А. — В кн.: Пленум Всесоюзного научно-мед. о-ва патофизиологов. Материалы. Ереван, 1974, с. 71. — 4. Кулагин В. К., Давыдов В. В. — В кн.: Стресс и его патогенетические механизмы. Кишинев, 1973, с. 28. — 5. Криворучко Б. И. — В кн.: Травматический шок. Л., 1976, вып. 3, с. 28. — 6. Eckstein В., Kaplan D., Vogut A. — Bull. Res. Council. Israel, 1957, v. 6, p. 189. — 7. Третьякова К. А. Изменение цитохромоксидазной и сукциндегидрогеназной активности тканей при атеросклерозе и атеросклерозе в сочетании с гипертонией по данным эксперимента. Автореф. дис. канд. М., 1955. — 8. Mortensen E. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1964, v. 16, p. 87. — 9. Owen J. A., Iggo B. — Biochem. J., 1956, v. 62, p. 675. — 10. Awaraga J. — J. biol. Chem., 1949, v. 178, p. 113. — 11. Лебедева З. Н., Нурпахметова З. Ю. — Вопр. питания, 1964, № 4, с. 23. — 12. Цанев Р. Р., Марков Г. Г. — Биохимия, 1960, № 1, с. 151. — 13. Юденренд С. (Udenfriend S.) Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., 1965.

Поступила 23/IV 1978 г.

SOME BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN ADRENAL GLANDS AND THEIR ROLE IN MECHANICAL TRAUMA

V. I. Nigulyanu

Chair of Pathophysiology, Medical School, Kishinev

Concentration of corticosterone, activities of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase, contents of ascorbic acid, reduced glutathione, free amino acids, RNA and DNA were studied in rat and rabbit adrenal glands within 10 min, 5, 10 and 24 hrs after crushing of the soft tissues of posterior extremities under conditions of unaltered and stimulated by ACTH functioning of adrenal glands. Stable increase in the biochemical parameters studied, caused by the ACTH effect, occurred in adrenal glands under this pathology.

УДК 612.311.1-015.31:[612.311.1.015.348+612.311.1.015.3.612.397

К. С. Десятниченко

ОБ УЧАСТИИ БЕЛКОВО-ЛИПИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ В МИНЕРАЛИЗАЦИИ ЗУБНОЙ ЭМАЛИ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Омского медицинского института и кафедры биохимии Московского медицинского стоматологического института

При нейтрализации раствора зубной эмали образуется нерастворимый комплекс белок — липиды — фосфат кальция. Смесью хлороформа с метанолом удаётся экстрагировать неполярные липиды, фосфолипиды сохраняют связь с твердой фазой. Инкубирование осадка препарата эмали в растворе анионного детергента солюбилизует белок эмали и делает его доступным электрофоретическому исследованию. Обсуждается характер участия белка и липидов зубной эмали в ее кальцификации. На основании сходства в основных чертах молекулярной структуры органических матрицков различных минерализованных тканей высказано предположение об универсальности механизма биологического обызвествления.

В изучении минерализованных тканей одной из важнейших задач является выяснение механизма биологического обызвествления [1, 2]. Способность к кальцификации, по-видимому, определяется особенностями строения органического матрикса. В разное время в качестве «местного фактора минерализации» рассматривали отдельные компоненты органического матрикса: гликозаминогликаны [3], коллаген [4], липиды [5]. Каждое из направлений внесло существенный вклад в представления о строении минерализованных тканей на разных этапах их формирования, но сущность биологического обызвествления до сих пор не выяснена.

В настоящее время ясно, что роль местного фактора минерализации могут выполнять не отдельные компоненты органического матрикса, а интегральные свойства комплекса компонентов, находящихся в специфической связи при определенном качественном и количественном соотношении. Для получения информации о биологическом обызвествлении мы изучали состав и свойства органической матрицы зубной эмали, в частности характер связи белковых фракций и минеральной фазы [6].

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия липидов с белковой матрицей и неорганическими компонентами эмали. С этой целью исследовали экстрагируемость липидов из препаратов эмали в зависимости от фазового состояния ее минералов, а также с помощью гель-хроматографии и электрофореза изучали состав эмалевых белков, модифицированный избирательной экстракцией липидов и обработкой анионным детергентом.

Методы исследования

Получение препаратов эмали описано нами ранее [6]. Были использованы осадок эмали, отмытый дистиллированной водой, и суспензия осадка в жидкой фазе, из которой двумя этапами экстрагировали липиды. На 1-м этапе суспензию экстраги-

ровали по Фолчу, затем твердую фазу отделяли фильтрованием и растворяли разведенной HCl при конечном pH 4,0. Полученный раствор повторно экстрагировали смесью Фолча. Часть подкисленного раствора отбирали для гель-фильтрации на колонке 1,8×60 см с сефадексом G-25 fine.

Липидные экстракты раздельно выпаривали при 5—10 мм рт. ст. и 40—45°C. Сухие экстракты растворяли в хлороформе с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержались липиды из 10 г эмали, и использовали для качественного определения липидов. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках 13×18 см с силикагелем DC (Woelm) толщиной 250—300 мкм. Для разделения липидов на основные классы применяли систему гептан — этиловый эфир — уксусная кислота (80 : 20 : 1), для разделения фосфолипидов — хлороформ — метанол — 25% аммиак (60 : 35 : 5). Хроматограммы проявляли 0,5% раствором роданина Б в этаноле с обнаружением хроматографических пятен в ультрафиолете (УФ) при $\lambda_{\text{max}}=365$ нм. Липиды идентифицировали по R_f .

Часть осадка, не обработанного растворителями, суспендировали 16 ч в 0,01 М фосфатном буфере с 1% додецилсульфата натрия (ДС) при 37°C. Надосадок диализовали сутки против 0,01 М фосфатного буфера с 0,2% ДС и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле (ПАГ), содержащем 0,1% ДС [9]. При электрофорезе, как и при гель-хроматографии, в качестве белков — маркеров молекулярной массы — использовали иммуноглобулин G, сывороточный альбумин, овальбумин, папаин и РНК-азу.

Исследовали 8 проб эмали зубов человека и по 5 проб эмали свиней и крупного рогатого скота. Пробу готовили из 10—15 зубов, каждый анализ включал по 5—6 определений из каждой пробы. Материал обрабатывали статистически с помощью непараметрического показателя — критерия знаков (кз) [10].

Результаты и обсуждение

В пробах 1-го этапа экстрагирования, содержащих минеральные компоненты в твердой фазе, постоянно определяли холестерин, свободные жирные кислоты, диглицериды, нейтральный жир и эфиры холестерина (см. таблицу), но отсутствовали фосфолипиды. На

Экстрагируемость липидов из раствора зубной эмали в зависимости от фазового состояния фосфата Са

Фракции липидов	Экстракт I		Экстракт II	
	R_f	присутствие в пробе	R_f	присутствие в пробе
Холестерин	0,09	+		—
Свободные жирные кислоты	0,26	+		—
Диглицериды	0,43	+		—
Триглицериды *	0,52	+	0,52	±
Эфиры холестерина *	0,71	+	0,71	±
Фосфатидилсерин	—	—	0,13	+
Фосфатидилэтаноламин	—	—	0,22	+
Фосфатидилхолин	—	—	0,31	+
Кардиолипин	—	—	0,57	+

Примечание. Различия в присутствии отдельных липидных фракций в экстрактах I и II достоверны с $P_{\text{кз}} < 0,01$, за исключением отмеченных звездочкой, имеющих различия с $P_{\text{кз}} < 0,05$.

Для разделения фосфолипидов на подклассы на пластинки наносили удвоенное количество экстракта, но и в этом случае в пробах 1-го этапа фосфолипиды выявлены не были (см. рис. 1). На пластинках с экстрактами из проб, подкисленных до растворения минеральных солей, проявлялись фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, кардиолипин (см. рис. 1).

Элюционные профили растворенного осадка, отделенного после 1-го этапа экстрагирования, при гель-хроматографии в нейтральной среде не от-

хроматограммах, полученных в той же системе растворителей, в экстрактах 2-го этапа присутствовали фосфолипиды, которые проявлялись в виде светящегося ободка вокруг оставшегося на старте пятна пигментов эмали (рис. 1). Липидов других классов не обнаружено, за исключением двух проб, в которых проявлялись пятна, соответствующие триглицеридам и эстерифицированному холестерину. Площади этих пятен и интенсивность их свечения в УФ были значительно меньше, чем в пробах 1-го этапа экстрагирования.

Для разделения фос-

личались от описанных ранее [6], когда хроматографии подвергались растворы осадков, не обработанных органическими растворителями. Хроматография тех же проб в кислой среде (рН 4,0) показала меньшее дезагрегирование высокомолекулярной фракции, чем в пробах до экстрагирования неполярных липидов, при этом появилась промежуточная фракция с молекулярной массой около 42 000, очевидно, димер субъединиц (рис. 2).

Взаимоотношения Са-связывающего белка эмали, липидов и минеральной фазы демонстрируют и результаты электрофореза осадка эмали, обработанного ДС, который, как оказалось, солубилизирует белок, нарушая его связь с минеральной фазой. В столбиках ПАГ окрашивались 4—5 фракций (рис. 3). При сравнении их и белков-маркеров оказалось, что наиболее подвижная из них имеет молекулярную массу около 20 000, а три аподные — кратные по величине первой (43 000, 62 000 и 85 000) и являются, по-видимому, ее димером, тримером и тетрамером, что подтверждается данными [6], полученными ранее с помощью гель-хроматографии.

Известно, что большая часть липидов из кости, дентина и эмали экстрагируется после деминерализации, причем наиболее полярные — только после нее [11, 12]. При формальном сходстве результатов нашего исследования с этими данными они имеют качественно иное значение. Минеральные компоненты в наших пробах хотя и находились в твердой фазе, но, будучи пересажены из раствора аморфным фосфатом Са, были, естественно, намного дисперснее, чем этого можно было бы достигнуть измельчением нативной эмали. Поэтому можно утверждать, что различия в экстрагируемости

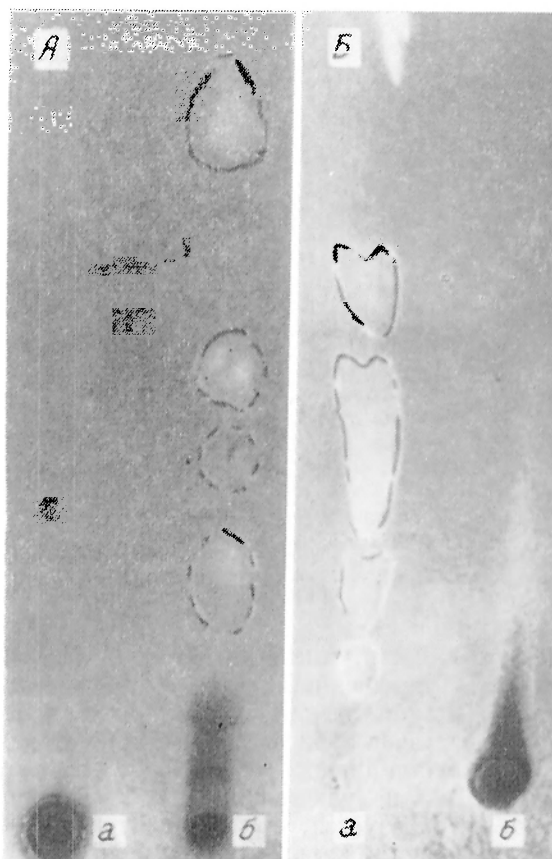


Рис. 1. Хроматограммы липидов зубной эмали.

А — основные классы липидов: а — экстракт II, б — экстракт I; Б — фосфолипиды: а — экстракт II, б — экстракт I.

полярных и неполярных липидов определяются только фазовым состоянием минеральных солей эмали, а не ее структурной целостностью. Установлено, что фосфолипиды способны связывать Ca^{2+} [13, 14]. Это, очевидно, и объясняет возможность образования в нейтральной среде нерастворимого комплекса фосфолипидов с фосфатом Са, устойчивого к действию неполярного растворителя, но диссоциирующего при изменении рН в кислую сторону.

Мы установили, что осаждение неорганических компонентов эмали сопровождается переходом в нерастворимое состояние и наиболее значительной фракции белка [15, 16], причем связь между белком и минеральной фазой осуществляют ионы Ca^{2+} [6]. С другой стороны, установлена возможность прочной связи между белком и полярными липидами [17, 18],

в образовании которой играют роль и полярные, и гидрофобные взаимодействия. Белок эмали способен образовывать комплексы с липидами, эффективно используя оба вида связей, имея высокое содержание как полярных, так и неполярных аминокислотных остатков в своем составе [19], что позволяет говорить о липофильности эмалевого белка [20]. Связывание липидов, безусловно, должно изменять конформационные свойства белка. В нашем эксперименте удаление неполярных липидов, вероятно, создает возможность их замены на освободившихся гидрофобных участках полипептидных цепей фосфолипидами, что, по-видимому, и объясняет большую устойчивость агрегатов Са-связывающего белка эмали в кислой среде.

Фазовый переход растворенных в тканевой жидкости неорганических солей составляет физико-химическую сущность биологического обызвествления, поэтому соосаждение минеральных компонентов эмали и органи-

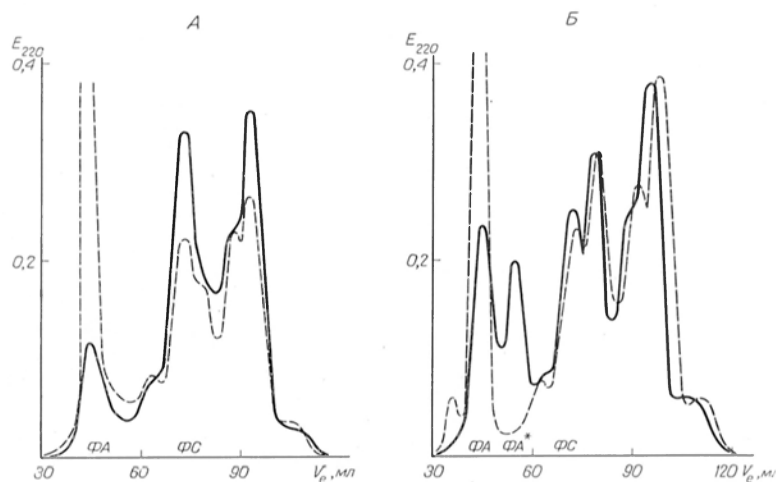


Рис. 2. Элюционные профили Са-связывающего белка при гельхроматографии. А — интактный осадок пробы эмали; Б — осадок пробы эмали после удаления неполярных липидов. Сплошная линия — хроматография при рН 4,0, пунктирная — то же при рН 6,8; ФА — фракция агрегированного белка; ФС — фракция субъединиц; ФА* — фракция димеров Са-связывающего белка. Различия профилей А и Б достоверны при $P_{113} < 0,05$.

ческих веществ, имеющих высокое сродство к минеральной фазе, может служить упрощенной моделью кальцификации. При использовании этой модели мы установили, что выпадение в осадок фосфата Са при нейтрализации раствора зубной эмали сопровождается образованием нерастворимого белково-липидного комплекса. Связь этого комплекса с фосфатом Са может быть нарушена обработкой раствором анионного детергента. Комплекс не образуется, если до нейтрализации из пробы удалить Ca^{2+} [16].

Недавно в кальцифицирующемся органическом матриксе кости описаны гранулы, содержащие органические и неорганические соединения [21]. Органические компоненты гранул — липиды и гликопротеид — тесно химически связаны с минеральными солями, и предполагается, что эти кальцифицированные глобулы играют роль в инициации минерализации. Описываемый гликопротеид, по всей вероятности, сиалопротеид — Са-связывающий белок кости [22]. Очевидно сходство химической структуры нерастворимого комплекса органических и минеральных компонентов эмали и обызвествляющегося костного матрикса.

Можно найти и другие параллели в строении органических матриц минерализованных тканей, различных по происхождению и функции. Например, наличие высокомолекулярного нерастворимого фибриллярного белка: в кости — коллагена, в эмали — ЭДТА, HCl-нерастворимого белка [6, 19], в раковине моллюсков — конхиолина [23]. Сходство химического

строения, естественно, предполагает наличие общих черт и в механизме обызвествления филогенетически различных тканей. Нам представляется возможным существование универсальной структурной супрамолекулярной единицы кальцификации, отдельные компоненты которой имеют видовые и тканевые особенности, но их сочетание в целом обеспечивает тождественность механизма биологического обызвествления у разных видов и в разных тканях.

Обязательными компонентами такой единицы, по нашему мнению, должны быть:

1) макромолекулы фибриллярного белка как «скелет» комплекса, организуемый его в пространстве, цементируя отдельные компоненты, обеспечивая механические свойства ткани и форму органа;

2) Са-связывающий белок, возможно, сложный — протеогликан, гликопротеин, сшивая фибриллы нерастворимого белка, стабилизирует весь комплекс, через ионы Ca^{2+} связывает минеральную фазу. Существует мнение, что фиксирование Ca^{2+} полипептидными цепями вызывает локальное увеличение рН, что уменьшает растворимость фосфата Са, способствуя его переходу в твердую фазу [24];

3) полярные и неполярные липиды, связанные с белком, гидрофобизируют весь комплекс, препятствуя тем самым деминерализующему воздействию среды вследствие колебаний рН, наличие соединений, образующих с Ca^{2+} растворимые соли (цитрата, кислых гликозаминогликанов). Защищенный таким образом аморфный фосфат Са приобретает возможность под влиянием нуклеаторов или спонтанно созревать в оксиапатит — более устойчивую термодинамически структуру [25]. Роль нуклеаторов кристаллизации, возможно, выполняют фосфолипиды [26, 27].

Оксиапатит менее растворим, чем аморфный фосфат Са и, вероятно, не нуждается в защитном действии липидов. Кроме того, дальнейший прирост минеральной фазы возможен только при дополнительном поступлении неорганических ионов, чему гидрофобность начальных очагов минерализации должна препятствовать. Описано появление эстеразной активности и исчезновение суданофилии в кальцифицирующихся тканях на определенных стадиях [5]. Гидролиз липидов в органическом матриксе, возможно, является фактором, регулирующим дальнейшее обызвествление.

Высокое содержание липидов в органическом матриксе зрелой эмали [12], липофильность эмалевого белка [20] приобретают особый физиологический смысл, если их рассматривать как защитный от деминерализации фактор. Зубная эмаль — единственная минерализованная ткань позвоночных, находящаяся в непосредственном контакте с внешней средой, состав которой постоянно меняется, а колебания рН достигают нескольких единиц [28]. Гидрофобность эмалевого органического матрикса, сосредоточенного в межпризменных пространствах — путях проникновения в глубокие слои эмали деминерализующих агентов, является, вероятно, фактором

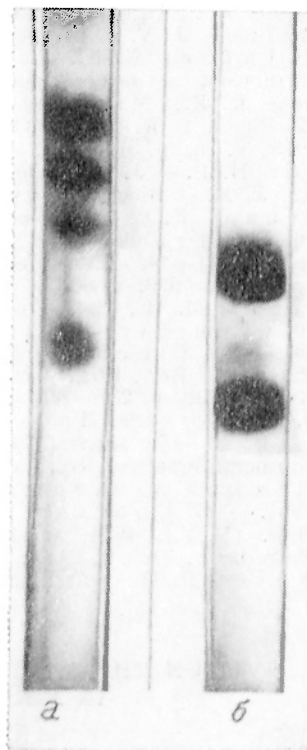


Рис. 3. Электрофорезграммы белков эмали и белков-маркеров в ПГ с додецилсульфатом натрия.

а — Са-связывающий белок эмали зубов свиньи; б — папаин и овальбумин.

резистентности эмали к повреждающему воздействию среды, прежде всего декальцинирующего воздействия органических кислот микробного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zambotti V., Bolognani L. — In: Callus Formation. Symposium on the Biology of Fracture Healing. Budapest, 1967, p. 5—34.
2. Isobe I. — Orthoped. Surg. (Tokyo), 1974, v. 25, p. 893—900.
3. Sobel L. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1955, v. 60, p. 713—717.
4. Glimcher M. J. — In: Calcification in Biological Systems. Washington, 1960, p. 421—487.
5. Irving J. T., Wuthier R. E. — Clin. Orthop., 1968, v. 56, p. 237—260.
6. Десятниченко К. С., Леонтьев В. К. — Вопр. мед. химии, 1977, № 2, с. 210—215.
7. Архипов А. В. — В кн.: Методические указания по исследованию липидного обмена у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1973, с. 61—73.
8. Маленко Г. П. — Там же, с. 87—89.
9. Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. V. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1967, v. 28, p. 815—820.
10. Гублер Е. В., Генкин А. А. — Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., 1973.
11. Dirksen R. R., Marinetti G. V. — Calcif. Tissue Res., 1970, v. 6, p. 1—11.
12. Prout R. E. S., Odutuga A. A., Tring F. C. — Arch. Oral. Biol., 1973, v. 18, p. 373—380.
13. Abramson M. B., Katzman R., Gregor H. P. — J. biol. Chem., 1964, v. 239, p. 70—76.
14. Rojas E., Tobias J. M. — Biochim. biophys. Acta, 1965, v. 94, p. 394—404.
15. Десятниченко К. С. — В кн.: Вопросы пародонтологии. Омск, 1974, с. 93—96.
16. Леонтьев В. К., Десятниченко К. С. — Стоматология, 1976, № 1, с. 11—14.
17. Reynolds J. A., Tanford Ch. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 66, p. 1002—1007.
18. Фельдштейн М. М., Матросовия М. Н., Зезин А. Б. и др. — Биохимия, 1974, № 5, с. 1003—1008.
19. Glimcher M. J., Levine P. T. — Biochem. J., 1966, v. 98, p. 736—741.
20. Fincham A. G., Burkland G. A., Shapiro I. M. — Calcif. Tissue Res., 1972, v. 9, p. 247—259.
21. Вонусси Е. — Collog. int. CNRS, 1975, v. 230, p. 231—245.
22. Siegel F. L. — Struct. and Bond., 1973, Bd 17, S. 221—268.
23. Дроздова Г. В., Карякин А. В., Краснова В. А. — Ж. эволюц. биохимии, 1971, № 4, с. 350—356.
24. Wadell W. J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1972, v. 49, p. 127—132.
25. Ньюман У., Ньюман М. (Неутан W., Неутан М.) Минеральный обмен кости. М., 1961.
26. Еппенверг J., Vogel J. J., Levy B. M. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1974, v. 145, p. 1386—1388.
27. Ngoma Z., Devis R. — Path.-Biol., 1976, v. 24, p. 307—311.
28. Charlton C., Fitzgerald R. J., Kees P. H. — Arch. oral. Biol., 1971, v. 16, p. 649—654.

Поступила 28/IV 1978 г.

ON THE PARTICIPATION OF LIPOPROTEIN COMPLEXES IN MINERALIZATION OF DENTAL ENAMEL

K. S. Desyatnichenko

Central Research Laboratory, Medical School, Omsk, Chair of Biochemistry, Institute of Stomatology, Moscow

Insoluble complex protein-lipid-calcium phosphate was formed on neutralization of dental enamel solution. Nonpolar lipids were extracted by chloroform-methanol mixture; the phospholipids maintained their connection with the solid phase. After incubation of the enamel precipitate with an anionic detergent the enamel protein became solubilized and was studied by means of electrophoresis. The role of proteins and lipids in calcification of the dental enamel is discussed. Biological calcification appears to operate via a universal mechanism, as evidenced by similarity in molecular structures of organic mixtures of various mineralized tissues.

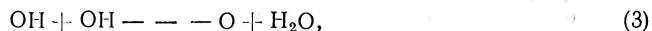
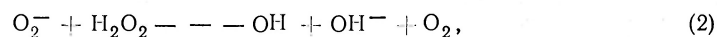
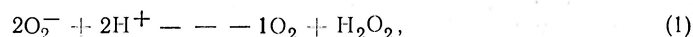
В. Н. Чумаков, Л. Ф. Осинская

АКТИВНОСТЬ ЦИНК-, МЕДЬСОДЕРЖАЩЕЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ТКАНЯХ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ГИПОКСИИ

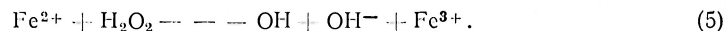
Центральная научно-исследовательская лаборатория Минского медицинского института

В опытах на белых крысах установлено, что острая гипоксическая гипоксия вызывает значительное снижение активности цинк-, медьсодержащей супероксиддисмутазы (СОД) в растворимой фракции печени и мозга и менее выраженное — в митохондриях печени и мозга, микросомах печени, эритроцитах и плазме крови. Предполагается взаимосвязь между гипоксическим снижением активности СОД и постгипоксическим накоплением гидроперекисей липидов.

Открытие в тканях животных и человека ферментных систем, обеспечивающих одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода до супероксидного анионного радикала [1, 2] и ферментов — супероксиддисмутаз, утилизирующих эти радикалы [3—6], явилось свидетельством непрерывного образования *in vivo* активных форм кислорода. Супероксидные радикалы в результате последовательных неферментативных реакций могут превращаться в электронно-возбужденный синглетный кислород, гидроксильные радикалы, атомарный кислород и озон [7—10]:



Основным продуктом неферментативного преобразования супероксида является синглетный кислород, так как константа скорости реакции (2) очень низкая [11]. В присутствии ионов железа, кроме синглетного кислорода, возможно образование больших количеств гидроксильных радикалов по реакции Фейттона [12]:



Высокая агрессивность синглетного кислорода, а также гидроксильных радикалов и продуктов их преобразования обеспечивает интенсивное перекисление липидов биологических мембран при введении комплекса АДФ-Fe³⁺ в системы, продуцирующие O₂⁻ (НАДФ·Н—НАДФ·Н цитохром P₄₅₀ редуктаза, ксантин-ксантиноксидаза). В зависимости от условий оно может тормозиться или супероксиддисмутазой (СОД), препятствующей образованию синглетного кислорода в реакции (1), или каталазой и ингибиторами ОН-радикалов, тормозящих реакции (2—5). Так, стимулированное ксантин-ксантиноксидазной системой и АДФ-Fe³⁺ перекисление липидов в митохондриях и микросомах печени тормозится СОД, а ингибиторы гидроксильных радикалов и каталаза оказывают активирующее действие [13, 14], что свидетельствует о перекислении по пути преобразования супероксидного радикала в синглетный кислород. Напротив, перекисление липидов лизосом печени в присутствии НАДФ·Н-микросомальной или ксантин-ксантиноксидазной систем и АДФ-Fe³⁺ не тормозится, а активируется СОД. Оно тормозится ингибиторами ОН-радикалов и каталазой, что доказывает преимущественное перекисление по гидроксильно-радикальному пути [15—16]. В то же время имеются сведения, что НАДФ·Н-стимулируемое перекисление липидов микросом печени не тормозится СОД или ингибиторами ОН-радикалов, а зависит от восстановления АДФ-Fe³⁺.

комплекса и наличия эндогенных перекисей, из которых образуются перекисные радикалы, ведущие цепь перекисления [17, 18].

Указанные пути перекисления липидов могут наблюдаться *in vivo*. Учитывая эту возможность и литературные данные об активации перекисления липидов при гипоксии и в постгипоксическом периоде [19—21], мы исследовали влияние острой гипоксической гипоксии на активность цинк-, медьсодержащей СОД в тканях крыс.

М е т о д и к а

Опыты были поставлены на беспородных белых крысах — самцах массой 180—250 г. Острую гипоксическую гипоксию вызывали путем выдерживания крыс в течение 2 ч в вентилируемой лабораторной барокамере при давлении 198 мм рт. ст., соответствующем высоте 10 000 м. Животных забивали путем декапитации тотчас после приведения барокамеры к нормобарическим условиям. Кровь из шейных сосудов собирали в пробирку с раствором гепарина, центрифугировали при 2500 г 10 мин для получения плазменной (с примесью тромбоцитов) и эритроцитарной (содержащей лейкоциты) фракций. Стабилизация крови гепарином позволяла получать плазму без видимых следов гемолиза. В опытах по изучению внутриклеточного распределения СОД печень крыс отмывали от крови через воротную вену холодной средой выделения, а при получении фракций учитывали их объем и исходную массу ткани. Субклеточные фракции печени и мозга крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования с помощью рефрижераторной центрифуги ЦЛР-1 (со скоростью насадкой). Среда выделения: 250 мМ сахараза, 10 мМ трис-НСI рН 7,4 и 1 мМ динатриевая соль ЭДТА. Гомогенат (1 : 10) печени и мозга получали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым нестиком (скорость вращения 5000 об/мин) в течение 20 с при 0°C. Ядерную фракцию (ядра и обрывки клеток) выделяли при 2500 об/мин (~600 г) в течение 10 мин, митохондриальную фракцию — при 10 000 об/мин (~8000 г) в течение 10 мин с последующим однократным промыванием осадка митохондрий. Постмитохондриальный супернатант центрифугировали при 12 000 об/мин (~10 000 г) в течение 10 мин, осадок отбрасывали. Полученный супернатант использовали для выделения фракции тяжелых микросом путем центрифугирования при 18 000 об/мин (~30 000 г) в течение 30 мин с последующим однократным промыванием в половинном объеме среды выделения. Супернатант, оставшийся после выделения микросом, использовали как фракцию цитозоля (гиалоплазмы). Полученные фракции субклеточных органелл диспергировали в небольшом объеме среды выделения и хранили в ледяной бане при 0°C. Перед определением активности СОД исследуемый материал разводили в 0,5% растворе дезоксихолата натрия (рН 7,8) для высвобождения СОД из митохондрий, микросом и эритроцитов. Эритроцитарный гемолизат не освобождали от гемоглобина, так как его влияние на супероксидгенерирующую систему [22] учитывается контролем (биологический материал + KCN). Следует отметить обязательность промывания митохондрий и микросом после выделения, так как примеси цитозоля завышают результаты, и необходимость добавления дезоксихолата, так как в его отсутствие активность СОД в отмых органеллах, в частности в микросомах, не выявляется.

Количественное определение цинк-, медьсодержащей СОД проводили по предложенному нами методу [22], по которому активность фермента соответствует степени цианидчувствительного снижения концентрации супероксида в фотохимической системе (тетраметилэтилендиамин + рибофлавин + свет + O₂), а в качестве индикатора O₂⁻ используется паранитротетразолий хлористый (НТХ). Активность фермента выражается в единицах (50% торможения продукции формазанов НТХ—1 ед.) с помощью калибровочной кривой или формулы: ед. акт. = $10^{(0,026 \times \% \text{торм} - 1,3)}$ и пересчитывается на количество биологического материала. Белок определяли по методу Лоури [23].

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

Исследование интактных крыс показало, что наибольшей активностью Zn²⁺, Cu²⁺-СОД отличается ткань печени, где на 1 г сырой массы (5120 ± ±326 ед/г) приходится в 3 раза больше фермента, чем на 1 мл крови (1613 ± ±91 ед/мл). При исследовании распределения фермента по субклеточным фракциям печени 88,6% активности было выявлено в цитозоле, 6,6% — в ядерной фракции, 3,4% — в митохондриальной фракции и 1,4% — в фракции тяжелых микросом (табл. 1). В крови более 98% СОД обнаруживалось в эритроцитарной фракции, содержащей лейкоциты (табл. 2). Так как доля лейкоцитов среди форменных элементов крови небольшая, можно счи-

тать, что основная часть супероксиддисмутазной активности крови связана с эритроцитами. Активность Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД, выявляемая в плазме крови, возможно, обусловлена примесью тромбоцитов [24], хотя нельзя исключить наличия следовых количеств фермента, поступающего в кровь в процессе естественного обновления тканей. По сравнению с печенью и кровью мозг крыс отличается наименьшей активностью Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД, сосредоточенной преимущественно в цитозоле (табл. 3). Полученные нами данные о распределении Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД в печени, мозге и крови крыс в основном совпадают с литературными сведениями об общей супероксиддисмутазной активности тканей [25—27], что можно объяснить низкой активностью Mn^{3+} -СОД и ее преимущественным сосредоточением в митохондриях [28].

Т а б л и ц а 1

Активность цинк-, медьсодержащей СОД в субклеточных фракциях печени интактных крыс (в ед. на 1 г сырой ткани)

Субклеточные фракции					Гомогенат
растворимая фракция	микросомы	митохондрии	ядра	сумма фракций	
4209±279 88,6% (5)	66±6 1,4% (2)	162±44 3,4% (6)	315±59 6,6% (5)	4752 100%	5120±326 (4)

Т а б л и ц а 2

Активность цинк-, медьсодержащей СОД в крови крыс в норме и при гипоксии (в ед. на 1 мл)

Серия опыта	Кровь	Эритроциты	Плазма
Контроль	1613±91 (8)	3322±216 (10)	51±5,6 (8)
Гипоксия	1309±96 (10)	2457±199 (10)	37±6,6 (8)
<i>P</i>	<0,05	<0,01	<0,02*

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 3: звездочка — разностный метод статистической обработки; в скобках — число опытов.

Т а б л и ц а 3

Влияние гипоксии на активность цинк-, медьсодержащей СОД в субклеточных фракциях печени и мозга крыс (в ед. на 1 мг белка)

Орган	Серия опыта	Цитозоль	Митохондрии	Микросомы
Печень	Контроль	60,9±7,4 (10)	3,0±0,5 (9)	1,3±0,1 (10)
	Гипоксия	32,4±2,0 (10)	2,0±0,3 (9)	0,9±0,1 (10)
	<i>P</i>	<0,01	<0,02*	<0,05
Мозг	Контроль	5,3±0,4 (12)	1,3±0,06 (9)	—
	Гипоксия	3,4±0,5 (12)	1,0±0,01 (9)	—
	<i>P</i>	<0,01	<0,02	—

Следует отметить большую термолабильность супероксиддисмутазной активности биологического материала. Так, в наших опытах митохондрии печени при 75°C через 5 мин инкубации сохраняли 43% исходной активности (хранение при 0°C), а через 15 мин — лишь 12%. Несколько большей стойкостью отличалась супероксиддисмутазная активность растворимой фракции — через 15 мин инкубации при 75°C сохранялось 25% активности. Инкубация при 100°C в течение 5 мин полностью лишает биологический материал ферментативных свойств.

Фермент легко инактивируется высокими концентрациями детергентов. Даже кратковременная (несколько минут) обработка митохондрией 1,6% тритоном X-100 инактивирует Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД практически полностью, а под влиянием 2,5% дезоксихолата натрия активность фермента через 2—3 мин снижается более чем наполовину, несмотря на последующее разведение до 0,5% конечной концентрации. В наших первых опытах по изучению влияния гипоксии на активность Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД снижение активности фермента при подобной обработке дезоксихолатом препятствовало выявлению эффектов гипоксии, поэтому для высвобождения фермента из органелл мы стали применять 0,5% раствор дезоксихолата натрия (исходная и практически конечная концентрация). Это позволило выявить при острой гипоксии выраженное снижение активности Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД в исследуемых тканях крыс: в эритроцитах и плазме крови, в субклеточных фракциях печени и мозга.

После 2-часового пребывания крыс в барокамере при давлении, соответствующем высоте 10 000 м, отмечалось значительное снижение активности фермента в цитозоле печени и мозга (соответственно на 47 и 36%) и умеренное (на 25—30%) в митохондриях печени и мозга, микросомах печени, эритроцитах и плазме крови (см. табл. 3). Почти двукратное снижение активности фермента в растворимой фракции при отсутствии изменений содержания белка (23,0 и 22,4 мг/мл), понижение активности на $1/3$ в митохондриях и микросомах не представляется возможным объяснить внутриклеточным перераспределением, так как указанные фракции содержат 90% клеточной супероксиддисмутазы. Хотя содержание Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД в ядерной фракции и фракции легких митохондрий при гипоксии не определялось, трудно представить, что они могут вместить при гипоксии более 50% клеточной СОД при емкости в обычных условиях менее 10% (см. табл. 1). Увеличение проницаемости плазматических мембран при гипоксии создает условия для выхода цитоплазматических ферментов в кровь. Однако кратковременность гипоксического воздействия (2 ч) и снижение активности Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД не только в эритроцитах, но и в плазме крови не позволяет говорить о таком перераспределении. В связи с этим выявленные изменения следует признать истинным снижением активности фермента, обусловленным или агрегацией в неактивные комплексы, или инактивирующим действием гидроперекисей [29] и естественных детергентов, или другими причинами.

Следует указать, что ранее [30] нами было обнаружено снижение активности СОД в постмикросомальной фракции печени крыс при 3- и 4-недельной тренировке к гипоксии (ежедневное пребывание на «высоте» 7000 м в течение 2 ч). У этих животных, особенно на 4-й неделе эксперимента, отмечались признаки перетренированности — через сутки после окончания тренировки выявлялись изменения, характерные для острой гипоксии: активация микросомальной НАД·Н-оксидазы при некотором торможении НАДФ·Н-зависимых функций микросом, умеренное снижение сопряженности дыхания с фосфорилированием в митохондриях [31]. По нашему мнению, сохранение низкой активности СОД в течение суток после гипоксического воздействия может оказать влияние на развитие постгипоксических изменений в тканях.

Является ли снижение активности Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД существенной причиной увеличения переокисления липидов в условиях гипоксии и значительного его возрастания в постгипоксическом периоде?

Как мы отмечали во введении, в условиях *in vivo* возможно три пути переокисления липидов: 1) синглетно-кислородный, зависящий от продукции O_2^- , низкой супероксиддисмутазной и высокой каталазной активности, 2) гидроксильно-радикальный, зависящий от образования H_2O_2 , АДФ- Fe^{2+} и низкой каталазной активности, 3) перекисно-радикальный, зависящий от появления комплекса АДФ- Fe^{2+} и наличия небольших количеств эндогеи-

ных перекисей. При острой гипоксии, особенно ишемического типа, накопление гидроперекисей липидов по первому и второму пути маловероятно, так как продукция O_2^- и H_2O_2 будет лимитироваться низкой концентрацией кислорода [32]. Оно должно обеспечиваться преимущественно третьим путем — перекисно-радикальным, Fe^{2+} -зависимым.

На наш взгляд, гипоксическое снижение активности Zn^{2+} , Cu^{2+} -СОД может быть существенной причиной активации перекисления липидов лишь в постгипоксическом периоде. В этом периоде в тканях с высоким содержанием каталазы (печень, кровь, почки) низкая активность СОД будет благоприятствовать перекислению по синглетно-кислородному пути, а в тканях с низким содержанием каталазы (мозг, сердце, легкие), кроме синглетно-кислородного, может активироваться и гидроксильно-радикальный путь перекисления липидов. Правомерность высказанных соображений в некоторой степени подтверждается данными об эффективном защитном действии иопола — ингибитора свободных радикалов при ишемическом повреждении почек [32] — и сведениями о способности гистидина — тушителя синглетного кислорода — предупреждать накопление перекисей липидов в крови, печени и сердечной мышце при экспериментальном инфаркте миокарда [33].

ЛИТЕРАТУРА

1. Aust S. D., Roerig D. L., Pederson T. C. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 47, p. 1133. — 2. Dionisi D., Gascotti T., Terapanova T. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1975, v. 403, p. 292. — 3. McCord J. M., Fridovich J. — *J. biol. Chem.*, 1969, v. 244, p. 6049. — 4. Weisiger R. A., Fridovich J. — *Ibid.*, 1973, v. 248, p. 3582. — 5. Турков М. И. — *Успехи совр. биол.*, 1976, т. 81, вып. 3, с. 341. — 6. Мишин В. М., Ляхович В. В. — Там же, т. 82, вып. 3, с. 338. — 7. Мерзляк М. Н., Соболев А. С. — В кн.: *Биофизика*. М., 1975, т. 5, с. 118. — 8. Westenberg A. L., de Haas N. — *J. chem. Physics.*, 1973, v. 58, p. 4066. — 9. Вейс Дж. — В кн.: *Катализ. Исследования гомогенных процессов*. М., 1957, с. 159. — 10. Разумовский С. Д., Заиков Г. Е. *Озон и его реакции с органическими соединениями*. М., 1974, с. 41. — 11. Rigo A., Stevanato R., Finazzi-Agro A. F. et al. — *FEBS Letters*, 1977, v. 80, p. 130. — 12. Нонхивел Д., Уайон Дж. *Химия свободных радикалов*. М., 1977, с. 382. — 13. Tyler D. D. — *FEBS Letters*, 1975, v. 51, p. 180. — 14. Pederson T. C., Aust S. D. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1973, v. 52, p. 1071. — 15. Fong K.-L., McCay P. B., Poyer J. L. — *J. biol. Chem.*, 1973, v. 248, p. 7792. — 16. McCay P. B., Fong K.-L., King M. et al. *Lipids*. Ed. R. Paoletti et al. New York, 1978, v. 1, p. 157. — 17. Pederson T. S., Aust S. D. — *Biochim. biophys. Acta*, 1975, v. 385, p. 232. — 18. Арчаков А. И. *Микросомальное окисление*. М., 1975, с. 178. — 19. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М., 1972, с. 207. — 20. Портнов Ф. Г., Гольдштейн Н. И., Сондоре А. Л. — В кн.: *Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии*. М., 1976, с. 157. — 21. Архипенко Ю. В., Биленко М. В., Добрин С. К. и др. — *Бюлл. экспер. биол.*, 1977, № 6, с. 683. — 22. Чумаков В. Н., Осинская Л. Ф. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 5, с. 712. — 23. Lowry O. H. et al. — *J. biol. Chem.* 1951, v. 193, p. 265. — 24. Гусев В. А., Ламчингийн Т., Герасимов А. М. — *Бюлл. экспер. биол.*, 1977, № 8, с. 166. — 25. Tyler D. D. — *Biochem. J.*, 1975, v. 147, p. 493. — 26. Peeters-Yoris C., Vandergoerde A. M., Baudhuin R. — *Ibid.*, 1975, v. 150, p. 31. — 27. Герасимов А. М., Королева Л. А., Брусов О. С. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1976, № 1, с. 89. — 28. Panchenko L. F., Brusov O. S., Gerasimov A. M. et al. — *FEBS Letters*, 1975, v. 55, p. 84. — 29. Махайлов Ю. Е., Герасимов А. М., Гусев В. А. и др. — *Бюлл. экспер. биол.*, 1976, № 8 с. 959. — 30. Чумаков В. Н. — В кн.: *Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины*. Минск, 1975, с. 53. — 31. Осинская Л. Ф., Смельянская Г. И., Чумаков В. Н. — Там же, с. 51. — 32. Алексенко А. В., Биленко М. В., Шеленкова Л. Н. — В кн.: *Свободно радикальное окисление липидов в норме и патологии*. М., 1976, с. 4. — 33. Якушев В. С., Лифшиц Р. И. — *Вопр. мед. химии*, 1976, № 4, с. 476.

Поступила 23/V 1978 г.

ACTIVITY OF Zn²⁺, Cu²⁺-CONTAINING SUPEROXIDE DISMUTASE FROM RAT TISSUES IN NORMAL STATE AND UNDER HYPOXIA

V. N. Chumakov, L. F. Osinskaya

Central Research Laboratory, Medical School, Minsk

Acute hypoxic hypoxia caused a distinct decrease in activity of Zn²⁺, Cu²⁺-containing superoxide dismutase in cytosols of rat liver and brain tissues and less distinct — in liver mitochondria and microsomes, brain mitochondria and blood plasma. On the basis of the data published in the literature, hypoxic inhibition of the enzyme appears to be the significant reason for the posthypoxic activation of singlete-oxygen pathway of lipid peroxidation in tissues, enriched with catalase /liver, kidney, blood/ as well as of hydroxyl-radical pathway of peroxidation in tissues with the low catalase activity /brain, heart, lungs/.

УДК 577.175.85 «32»

Л. К. Токаева, Т. Д. Царева

СЕЗОННЫЕ КОЛЕБАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ

Саратовский медицинский институт, кафедра физиологии человека, кафедра инфекционных болезней

Изучено состояние кининовой системы у здоровых людей молодого и зрелого возраста в различные сезоны года. Установлены сезонные колебания уровня кининогена, калликреиногена, БАЭЭ-эстеразной, антитриптической и кининазной активности сыворотки крови. Кининовая система молодых людей менее подвержена сезонным влияниям, чем людей зрелого возраста.

В исследованиях последних лет уделяется значительное внимание функциональному состоянию калликреин-кининовой системы при сердечно-сосудистой патологии [1], роли этой системы в патогенезе ожоговой болезни [2], гастроэнтерологии [3], патологии органов дыхания [4]. Однако для сопоставления наблюдаемых изменений в активности кининовой системы в условиях патологии необходимо иметь данные о ее функциональном состоянии у людей разных возрастных групп с учетом времени года. Принимая во внимание отсутствие подобных сведений, мы решили изучить состояние калликреин-кининовой системы у людей молодого и зрелого возраста в различные сезоны года.

М е т о д и к а

Обследовано 100 человек: 52 человека молодого возраста (18—29 лет) и 48 лиц зрелого возраста (30—44 года). Для комплектования возрастных групп пользовались геронтологической классификацией, принятой в 1962 г. в Ленинграде на съезде геронтологов. Кровь для исследования получали из локтевой вены силиконированной иглой в силиконированную посуду. Все дальнейшие исследования производили в силиконированной посуде. Определяли БАЭЭ-эстеразную активность сыворотки крови по методу [5]. Уровень кининогена исследовали, пользуясь методом Диница в модификации Т. С. Пасхиной и Т. П. Егоровой [6]. В качестве стандарта применяли синтетический брадикинин фирмы «Reanal». Активность калликреиногена и калликреина изучали по методу Т. С. Пасхиной и А. В. Кринской [7]. Кининазную активность сыворотки крови определяли по методу [8], антитриптическую активность — по методу Т. С. Пасхиной и соавт. [2]. В работе использованы: N- α -бензоил-L-аргинин этиловый эфир (БАЭЭ) фирмы «Reanal», трипсин «Спофа», овомукоид Олайнского завода химических реактивов. Результаты исследований обработаны статистически [9].

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

Установлено, что у лиц молодого возраста (рис. 1) наиболее высокий уровень кининогена отмечается осенью, меньший — зимой и самый низкий — весной. Выявленные сезонные колебания количества кининогена в периферической крови людей молодого возраста статистически достоверны

($P < 0,05$). Самый высокий уровень калликреиногена наблюдается весной, несколько меньший — осенью и значительно меньший — зимой. Статистическая обработка выявила достоверные различия между количествами калликреиногена осенью и весной, весной и зимой ($P < 0,05$). Сезонные колебания БАЭЭ-эстеразной активности наблюдаются лишь между осенним и зимним периодами года. В этой возрастной группе не выявлено достоверных сезонных колебаний антитриптической и кининазной активности.

У людей зрелого возраста (рис. 2) самый высокий уровень кининогена обнаружен в зимнее время года, несколько меньший — осенью, еще ниже — летом, и наиболее низкий уровень — весной. Достоверные различия в содержании кининогена установлены между всеми сезонами года, за исключением различий этого показателя осенью и зимой. Обнаружено повышение уровня калликреиногена летом и зимой по сравнению с весной и осенью. Достоверные различия наблюдаются между осенними и зимними показателями, осенними и летними, весенними и зимними, весенними и летними ($P < 0,05$). БАЭЭ-эстеразная активность была наиболее высокой

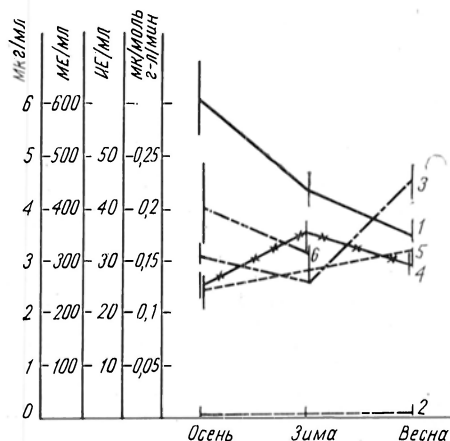


Рис. 1. Изменение содержания кининогена (1), калликреина (2), калликреиногена (3), БАЭЭ-эстеразной (4), антитриптической (5) и кининазной активности (6) сыворотки крови людей молодого возраста в зависимости от сезона года.

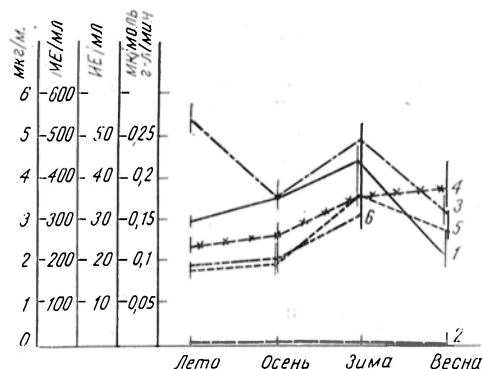


Рис. 2. Изменение содержания кининогена (1), калликреина (2), калликреиногена (3), БАЭЭ-эстеразной (4), антитриптической (5) и кининазной активности (6) сыворотки крови людей зрелого возраста в зависимости от сезона года.

весной, самой низкой — летом. Показатели БАЭЭ-эстеразной активности достоверно различны зимой и летом, весной и осенью, весной и летом. Сезонные колебания антитриптической активности совпадают с изменениями БАЭЭ-эстеразной активности. Зимой в этой возрастной группе выявлена наиболее высокая активность карбоксипептидазы N. Достоверные сезонные колебания кининазной активности отмечаются при сравнении с данными, полученными в летнее время года ($P < 0,05$). Содержание калликреина в сыворотке крови у людей молодого и зрелого возраста колебалось в небольших пределах (от 0 до 7,9 мг/мл).

Анализ полученных данных свидетельствует о наличии сезонных колебаний показателей калликреин-кининовой системы у взрослых людей. Уменьшение уровня кининогена весной можно связать со снижением белковообразовательной функции печени, которая является главным органом, синтезирующим кининоген плазмы крови [10]. Этим, по-видимому, обусловлены и изменения в содержании калликреиногена в крови. Изменения БАЭЭ-эстеразной активности связаны с различным содержанием в крови протеолитических ферментов (фактора XII, калликреина, плазмина, трипсина, тромбина), которое и определяет ее активность.

Меньше выражены изменения кининовой системы в летние и осенние периоды года, что подтверждается более высоким содержанием кининогена

и калликреиногена в сыворотке крови и ее меньшей БАЭЭ-эстеразной активностью.

Зимой наблюдается наиболее высокий уровень кининогена, калликреиногена, кининазы, антитриптической и БАЭЭ-эстеразной активности.

Свободный калликреин в сыворотке здоровых людей практически не определяется и незначительные колебания его содержания, обнаруженные нами, близки к ошибке метода [7].

Сезонные колебания компонентов кининовой системы у людей молодого возраста были четкими по отдельным показателям, но менее сопоставимыми друг с другом, что, возможно, свидетельствует о том, что кининовая система молодых людей менее подвержена сезонным колебаниям, чем кининовая система людей зрелого возраста. Различный характер сезонных изменений уровня отдельных компонентов кининовой системы у людей молодого и зрелого возраста пока можно связать лишь с возрастными, а возможно, и половыми, особенностями организма. Наличие сезонных колебаний показателей калликреин-кининовой системы здоровых людей необходимо иметь в виду при изучении данной системы в условиях патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дзизинский А. Л., Гомазков О. А. Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Новосибирск, 1976. — 2. Пасхина Т. С., Шрайберг М. И., Яровая Г. А. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1972, № 2, с. 137—145. — 3. Меньшиков В. В., Орлов В. А., Беляков Н. В. — *Клин. мед.*, 1972, № 1, с. 12—19. — 4. Суровикина М. С., Палеев Н. Р., Гаврилова Р. Д. — *Сов. мед.*, 1972, № 12, с. 59—66. — 5. Trautschold J., Werle S. — *Horre-Scylers Z. physiol. Chem.*, 1961, Bd. 325, S. 48—59. — 6. Пасхина Т. С., Егорова Т. П., Зыкова В. П. и др. — В кн.: *Современные методы в биохимии*. Под ред. Ореховича. М., 1968, т. 2, с. 232—244. — 7. Пасхина Т. С., Крипская А. В. — *Вопр. мед. химии*, 1974, № 6, с. 660—663. — 8. Folk J. S., Reiz R. A., Carpoll W. K. et al. — *J. biol. Chem.*, 1960, v. 235, p. 2272—2277. — 9. Кузнецов В. К. — В кн.: *Социально-гигиенические исследования*. М., 1970, с. 190—193. — 10. Diniz C. R., Carvalho J. F. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1963, v. 104, 77—88.

Поступила 23/V 1978 г.

SEASON VARIATIONS IN PATTERNS OF KALLIKREIN-KININE SYSTEM

L. K. Tokaeva, T. D. Tsareva

Chairs of Human Physiology, Infectious Diseases, Medical School, Saratov

State of kallikrein-kinine system was studied in 100 persons of young and mature age during various seasons of year. Season variations in content of kininogen, kallikreinogen as well as in BAEE-esterase activity of blood serum were observed in young persons. In mature persons the season variations of antitryptic and kininase activities were also observed in blood serum. The kinine system of young persons was apparently less subjected to season variations as compared with the persons of mature age.

УДК 616.61-008.64-036.12-08:616.61-78-07:616.155.1-008.931-07

А. И. Куликова, Л. А. Романчук, Ф. А. Тугушева,
В. Б. Чупрасов, Г. Д. Шостка

ВЛИЯНИЕ ГЕМОДИАЛИЗА НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Кафедра биохимии, кафедра пропедевтики внутренних болезней I Ленинградского медицинского института им. акад. И. П. Павлова

В эритроцитах больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН) обнаружено снижение активности Na^+ , K^+ -зависимой («транспортной») аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы) и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) на 35,5 и 14,5% соответственно наряду с возрастанием на 66% гексокиназной активности. K_m для ацетилтиохо-

лина у АХЭ находится в пределах $4,5-5,5 \cdot 10^{-5}$ М и не изменяется по сравнению с контролем. АХЭ эритроцитов при ХПН более устойчива к тепловой инактивации. При применении перманентного гемодиализа наблюдается сохранение высокой гексокиназной активности и повышенной устойчивости АХЭ к тепловой инактивации. Активность транспортной АТФ-азы при этом нормализуется, а активность АХЭ резко (на 41%) увеличивается, что можно рассматривать как проявление детоксикации и нормализации метаболизма.

АТФ-аза и АХЭ эритроцитов локализируются в мембране в составе прочных липопротеидных комплексов. В настоящее время твердо установлено, что так называемая транспортная, или Na^+ , K^+ -активируемая, АТФ-аза (КФ 3.6.1.3) располагается на внутренней поверхности мембраны и участвует в транспорте ионов Na^+ и K^+ , т. е. создает «натриевый насос» [1], и необходима для переноса в клетку аминокислот, моносахаридов и некоторых других низкомолекулярных веществ. АХЭ (КФ 3.1.1.7) находится на наружной поверхности мембраны и имеет отношение к трансмембранному переносу анионов, в частности фосфата [2]. Таким образом, состояние этих ферментов в значительной степени определяет внутриклеточный ионный баланс и, следовательно, может оказывать существенное влияние на метаболизм, функцию и сроки жизни эритроцитов.

Задачей настоящей работы являлось изучение активности указанных ферментов у больных с ХПН, которой, как правило, сопутствует тяжелая анемия. Причины и механизмы развития нефрогенной анемии еще нельзя считать полностью изученными. С целью объяснения полученных результатов исследованы также некоторые свойства АХЭ и активность гексокиназы как показатель метаболической активности эритроцитов.

М е т о д и к а

Для определения активности ферментов использовали трех-четырекратно отмытые физиологическим раствором эритроциты гепаринизированной венозной крови. Активность АХЭ определяли в гемолизате эритроцитов, полученном с помощью охлажденной бидистиллированной воды спектрофотометрическим методом Элмана [3] при 37°C . Инкубационная смесь содержала 0,3 мл гемолизата в разведении 1 : 400, 0,015 ммоль ацетилтихолина в качестве субстрата, 0,1 мкмоль реактива Элмана, 1,0 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 8,0 и дистиллированную воду до общего объема 3,0 мл. Активность АХЭ рассчитывали в миллимолях распавшегося субстрата за 1 ч на 1 г гемоглобина. Калибровочную кривую строили по цистеину. Количество гемоглобина определяли спектрофотометрически путем измерения поглощения при 540 нм [4]. Для определения константы Михаэлиса K_m использовали графический метод Лайнуивера и Берка [5], для чего активность АХЭ измеряли в диапазоне концентраций субстрата от 5×10^{-4} до $2,5 \times 10^{-5}$ М. Для установления процента тепловой инактивации АХЭ гемолизат инкубировали 20 мин при 50°C .

Активность АТФ-аз определяли в тенях эритроцитов, отмытых от гемоглобина с помощью бидистиллированной воды, так как известно, что в присутствии гемоглобина АТФ-азы малоактивны [6]. Отмытые тени суспендировали в 0,1 М растворе трис-НСI-буфера рН 7,4 и подвергали двукратной процедуре замораживания — оттаивания, после чего гомогенизировали и использовали для измерения активности.

Активность АТФ-аз определяли по приросту неорганического фосфата (ФН) после инкубации с АТФ в течение 1 ч при 37°C и рассчитывали в микромолях ФН на 1 мл плотно упакованных эритроцитов (полученных путем центрифугирования в течение 15 мин при 3000 об/мин на лабораторной центрифуге ЦЛК-1). Инкубационная смесь для определения общей АТФ-азы объемом 2,75 мл содержала 10 мкмоль динатриевой соли АТФ (фирмы «Reanal», Венгрия), 4,5 мкмоль MgCl_2 , 15 мкмоль КСI, 75 мкмоль NaCl, 225 мкмоль трис-НСI-буфера рН 7,4 и 0,5 мл теней эритроцитов. В качестве контроля служили пробы без теней, но содержащие АТФ, с целью учета значительно выраженного в слабощелочной среде неферментативного гидролиза АТФ. При определении Mg^{2+} -активируемой АТФ-азы инкубационная смесь содержала те же компоненты за исключением NaCl и КСI. Активность Na^+ , K^+ -зависимой, т. е. транспортной, АТФ-азы рассчитывали по разнице между активностью суммарной и Mg^{2+} -активируемой АТФ-аз. Предварительные опыты по определению Na^+ , K^+ -АТФ-азы с помощью убаина показали полную идентичность полученных результатов результатам, рассчитанным по разнице между общей и Mg^{2+} -зависимой АТФ-азой. Содержание ФН измеряли методом Фиске — Суббарроу в микромодификации Чена [7].

Для определения активности гексокиназы первоначальный 10% гемолизат дополнительно центрифугировали на холоду в течение 30 мин при 10 000 об/мин. Актив-

ность гексокиназы устанавливали энзиматическим методом с помощью глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, регистрируя поглощение при 340 нм за счет восстановления НАДФ.

Инкубационная смесь общим объемом 3,0 мл содержала 10 мкмоль динатриевой соли АТФ (фирмы «Reanal»), 6 мкмоль ЭДТА, 6 мкмоль глюкозы, 21 мкмоль $MgCl_2$, 15 мкмоль NaF , 0,1 мг препарата глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (фирмы «Fluka», Швейцария), 0,8 мкмоль НАДФ (фирмы «Reanal»), 0,3 мл гемолизата, 200 мкмоль трис-НСI-буфера рН 7,4. Ферментативную реакцию регистрировали по приросту оптической плотности через каждую минуту в течение 10 мин при 340 нм на спектрофотометре СФ-16 в термостатируемой кювете при 37°C. Активность гексокиназы выражали в микромолях образованного НАДФ·Н₂ на 1 г гемоглобина за 1 мин.

Результаты и обсуждение

Исследована группа практически здоровых лиц в возрасте от 17 до 45 лет и 3 группы лиц с заболеваниями почек: больные 1-й группы страдали гипертонической формой хронического гломерулонефрита, не осложненной ХПН, больные 2-й группы имели III стадию ХПН по классификации С. И. Рябова и Б. Б. Бондаренко [8], у больных 3-й группы также была III стадия ХПН, но они получали активную терапию с помощью перманентного гемодиализа. Его проводили 3 раза в неделю по 8—10 ч с использованием диализатора типа «Kiil» при стандартном составе диализирующего раствора. Кровь у больных брали в течение первого часа гемодиализа.

Таблица 1

Активность АТФ-аз и АХЭ эритроцитов обследованных лиц ($M \pm m$)

Группа обследованных	АТФ-аза, мкмоль ФН на 1 мл эритроцитов за 1 ч			АХЭ, ммоль субстрата на 1 г гемоглобина за 1 ч
	суммарная ($K^+ - Na^+ - Mg^{2+}$)	Mg^{2+} -активируемая	K^+ , Na^+ -зависимая	
Здоровые	$36,6 \pm 3,2$ (11)	$23,7 \pm 3,3$ (11)	$14,1 \pm 1,8$ (11)	$2,28 \pm 0,05$ (26)
Больные с хроническим гломерулонефритом в доазотемической стадии	$39,0 \pm 10,3$ (7)	$25,8 \pm 9,7$ (7)	$13,2 \pm 2,5$ (7)	$1,88 \pm 0,12$ (8)
Больные с хроническим гломерулонефритом (III стадия ХПН)	$30,1 \pm 3,5$ (25)	$20,1 \pm 3,8$ (25)	$9,1 \pm 2,4$ (25)	$1,95 \pm 0,06$ (33)
Больные, леченные гемодиализом	$45,8 \pm 5,7$ (15)	$30,1 \pm 4,8$ (15)	$15,3 \pm 1,8$ (15)	$2,74 \pm 0,08$ (17)

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

Как видно из табл. 1, у больных с заболеваниями почек, не осложненными ХПН, активность всех АТФ-аз практически такая же, как у лиц контрольной группы, а активность АХЭ заметно снижена (на 17%; $P < 0,02$). У больных с выраженными явлениями ХПН активность АХЭ также имеет тенденцию к снижению по сравнению с контролем (на 14,5%; $P < 0,1$) и, кроме того, значительно уменьшена активность K^+ , Na^+ -зависимой АТФ-азы (на 35,5%; $P = 0,05$). У ряда больных этой группы активность K^+ , Na^+ -АТФ-азы вообще не определяется, т. е. равна нулю. Активность гексокиназы в этих условиях, наоборот, повышена на 66% ($P < 0,01$).

Активная терапия гемодиализом приводит, как это видно из данных табл. 1, к нормализации K^+ , Na^+ -АТФ-азы и повышению активности АХЭ на 41,1% ($P < 0,001$) по сравнению с активностью АХЭ эритроцитов больных с ХПН, получавших консервативную терапию. Активность гексокиназы эритроцитов больных этой группы остается по-прежнему повышенной.

Из табл. 2 следует, что величина K_m для АХЭ эритроцитов у всех обследованных лиц практически не менялась. Процент тепловой инактивации снижен у больных с ХПН независимо от вида применяемой терапии, что

доказывает повышенную устойчивость ферментных систем эритроцитов больных с ХПН к внешним повреждающим факторам.

Близкие по значению величины K_m для АХЭ эритроцитов здоровых и больных людей указывают на отсутствие принципиальных различий в кинетических свойствах и структуре фермента.

Высокая активность гексокиназы и снижение процента тепловой инактивации АХЭ эритроцитов больных с ХПН свидетельствует, на первый взгляд, о преобладании в кровяном русле молодой популяции клеток [9—11]. Однако это предположение не подтверждается низким уровнем ретикулоцитоза (количество ретикулоцитов в крови этих больных не превышает 1%). Таким образом, можно предполагать, что анемия, сопровождающаяся ХПН, характеризуется наличием в кровяном русле особого пула эритроцитов, для которых характерна высокая метаболическая активность и повышенная устойчивость к повреждающим факторам внешней среды. Вместе с тем эритроцитам больных с ХПН, находящихся на обычной консервативной терапии, свойственна значительно сниженная активность «транспортной» АТФ-азы и более низкая активность АХЭ по сравнению с нормой. Лечение с помощью гемодиализа резко повышает активность изученных ферментов. Эти факты доказывают наличие токсического действия «уремической» плазмы на эритроциты при ХПН. Мы, как и другие исследователи

Т а б л и ц а 2

Показатели влияния ХПН на активность гексокиназы и свойства АХЭ эритроцитов ($M \pm m$)

Группа обследованных	Гексокиназа мкмоль НАДФ·Н ₂ на 1 г гемоглобина за 1 мин при 37° С	Тепловая инактивация АХЭ, %	K_m (М) для АХЭ
Здоровые	0,660±0,054 (15)	45,1±2,8 (9)	5,34·10 ⁻⁵ ±0,22·10 ⁻⁵ (9)
Больные с хроническим гломерулонефритом (III стадия ХПН)	1,100±0,120 (15)	33,8±3,7 (6)	5,00·10 ⁻⁵ ±0,18·10 ⁻⁵ (5)
Больные, леченные ге- модиализом	1,220±0,170 (8)	30,4±3,8 (4)	6,50·10 ⁻⁵ ±0,60·10 ⁻⁵ (7)

[12], не обнаружили корреляции между активностью мембранных ферментов и уровнем креатинина и мочевины плазмы крови. Не отмечено также зависимости активности ферментов от показателей кислотно-щелочного равновесия и ионного состава плазмы.

Вместе с тем удалось установить, что полное отсутствие АТФ-азной активности обнаружено в основном у больных с нефротическим синдромом, у которых концентрация холестерина плазмы резко увеличена (в пределах 300 мг% и более). Наоборот, у больных, находящихся на гемодиализной терапии, высокие цифры «транспортной» АТФ-азы коррелируют с низким содержанием холестерина (порядка 140—180 мг%). Поэтому нельзя исключить предположение, что гемодиализная терапия не только способствует выведению токсинов, но и вызывает глубокие изменения метаболизма, отражающиеся на активности эритроцитарных ферментов. Косвенным образом это подтверждается фактом снижения активности АХЭ эритроцитов больных с хроническим диффузным гломерулонефритом, находящихся в доазотемической стадии, когда гипотетические токсины в плазме отсутствуют.

Полученные результаты указывают на благоприятное действие гемодиализа в отношении активности ферментов, связанных с мембраной эритроцитов, и, таким образом, предполагают улучшение функции эритроцитов в этих условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ташмухамедов Б. А., Гагелъганс Л. И. Активный транспорт ионов через биологические мембраны. Ташкент, 1973. — 2. Волоотовский И. Л., Филипп В. С., Конев С. В. — В кн.: Биофизика мембран. Каунас, 1973, с. 144. — 3. Cili V. G., Ogan P. T. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 284, p. 136. — 4. Луганова И. С., Блинов М. Н. — Лабор. дело, 1975, № 11, с. 652. — 5. Lineweaver H., Burk D. — J. Am. chem. Soc., 1934, v. 56, p. 658. — 6. Hanahan D. L., Ekholm J. E., Luthra M. G. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 363, p. 283. — 7. Chen P. C., Trubila T. I., Wagner H. — Analyt. Chem., 1956, v. 28, p. 1756. — 8. Рябов С. И., Бондаренко Б. Б. — В кн.: Хроническая почечная недостаточность. Под ред. С. И. Рябова. Л., 1976, с. 21—23. — 9. Wallas Ch. H. — Brit. J. Haemat., 1974, v. 26, p. 71. — 10. Rosenmund A., Binswanger U., Straub P. W. — Schweiz med. Wschr., 1974, Bd 104, S. 1394. — 11. Herz F., Kaplan E. — Am. J. clin. Path., 1975, v. 43, p. 183. — 12. Cole C. H. — Clin. Sci., 1973, v. 45, p. 775.

Поступила 30/VIII 1978 г.

EFFECT OF HEMODIALYSIS ON ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE AND ADENOSINE TRIPHOSPHATASE FROM ERYTHROCYTES IN CHRONIC KIDNEY INSUFFICIENCY

A. I. Kulikova, L. A. Romanchuk, F. A. Tugusheva, V. B. Chuprasov, G. D. Shostka
Chairs of Biochemistry and Propedeutics of Internal Diseases, I. P. Pavlov I Medical School, Leningrad

Erythrocytes of patients with chronic kidney insufficiency exhibited high hexokinase activity as well as low activity of acetylcholinesterase and K^+ , Na^+ -dependent ATPase. The K_m value of acetylcholinesterase for acetyl thiocholine was not altered in the reaction and the enzyme proved to be more resistant to heat denaturation. Therapy with permanent hemodialysis /8-10 hrs per day within some months/ normalized K^+ , Na^+ -dependent ATPase activity and activated acetylcholinesterase. These effects may be considered as evidence for detoxication and normalization of metabolism. At the same time, high hexokinase activity and increased resistance of acetylcholinesterase to heat inactivation were maintained.

УДК 616.127-008.944.52-092.9-02:616.132.14-001.22

Н. А. Новикова

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НОРАДРЕНАЛИНА В МИОКАРДЕ КРОЛИКОВ ПРИ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ ДУГИ АОРТЫ

Лаборатория экспериментальной фармакологии Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Нанесение чрезвычайного раздражения на рефлексогенную зону дуги аорты кроликов приводит к истощению запасов норадреналина в сердечной мышце. Введение одного из предшественников норадреналина — L-ДОФА — не только предупреждает снижение уровня норадреналина в миокарде, но и полностью восстанавливает уже истощенные его запасы.

Симпатической нервной системе и ее медиатору — норадреналину придают большое значение в развитии сердечно-сосудистых заболеваний нейрогенной природы [1—4]. Доказаны рефлекторная природа нейрогенных повреждений внутренних органов и ведущее значение симпатической нервной системы в их развитии [1]. В связи с этим представляет интерес изучение содержания норадреналина в миокарде при его нейрогенном повреждении, чему посвящена настоящая работа.

Методы исследования

В экспериментальных исследованиях мы использовали разработанную нами модель нейрогенного повреждения миокарда у кроликов. Для этого животных наркотизировали путем внутривенного введения амиазина в дозе 5 мг/кг и солянокислого

морфина в дозе 10 мг/кг. Обнажали правый сосудисто-нервный пучок. Через правую общую сонную артерию в дугу аорты кролика вводили металлический электрод из нихрома диаметром 150 мкм в тонком полиэтиленовом катетере. Электростимуляции подвергали всегда один и тот же участок дуги аорты, для чего длину электрода рассчитывали соответственно массе животных. Свободным от изоляции оставляли конец электрода длиной 0,3—0,5 мм. Дистальный конец электрода находился в пространстве дуги аорты и фиксировался лигатурой на общей сонной артерии. Проксимальный конец выводили под кожу в область правого уха и закрепляли швом на марлевым тампоне. Рану прищипывали пенициллином и послойно зашивали. Через сутки кроликов использовали в опыте. Животных иммобилизовали. Электрод, находящийся в дуге аорты, и другой игольчатый электрод, введенный под кожу левой передней лапы, присоединяли к источнику тока. Электростимуляцию дуги производили непрерывно в течение 3 ч прямоугольными импульсами тока от электродного стимулятора ЭСТ-12 с частотой 50 Гц, длительностью 1 мс, при напряжении 2—5 В. Правильность местоположения электрода контролировали при вскрытии животных. Содержание норадреналина в ткани миокарда определяли флюорометрическим методом [5].

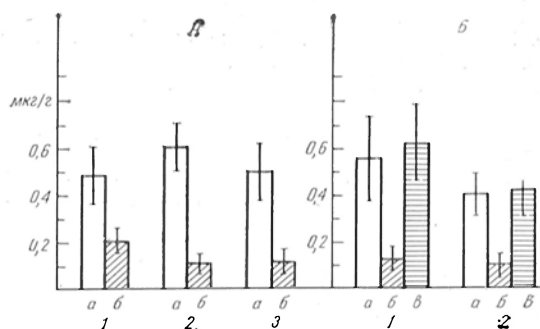
Опыты были поставлены на кроликах-самцах массой 2,5—3 кг. Содержание норадреналина исследовали после 15-минутной, 3-часовой стимуляции и спустя 48 ч после 3-часовой стимуляции дуги аорты. Контролем служил уровень норадреналина в миокарде интактных кроликов.

Результаты исследований

Результаты исследований показали, что уже после 15 мин стимуляции дуги аорты содержание норадреналина в миокарде снижалось более чем на 50%, достигая в среднем $0,2 \pm 0,27$ мкг/г при норме $0,48 \pm 0,057$ мкг на 1 г влажной ткани (см. рисунок). Еще в большей степени содержание норадреналина снижалось после 3 ч стимуляции, составляя всего $0,1 \pm 0,005$ мкг/г. Такое же низкое содержание норадреналина в миокарде сохранялось и через 48 ч после 3 ч электростимуляции. Таким образом, нейрогенное повреждение сердечной мышцы, вызываемое электростимуляцией рефлексогенной зоны дуги аорты кроликов, приводило к резкому истощению запасов норадреналина в сердечной мышце. Результаты наших исследований согласуются с ранее полученными данными о снижении уровня норадреналина в миокарде крыс после стимуляции дуги аорты [3].

Анализируя полученные данные, можно полагать, что сильнейший поток симпатических импульсов при чрезвычайных воздействиях на организм приводит к выбросу из тканевых депо больших количеств эндогенного норадреналина, ресинтез которого не поспевает за его расходом [1]. Дисбаланс тканевого норадреналина в миокарде приводит к глубоким нарушениям метаболизма, которые являются непосредственной причиной деструкции сердечной мышцы при ее нейрогенном повреждении [2]. В связи с этим мы использовали для восстановления нормального баланса норадреналина в ткани сердечной мышцы один из предшественников норадреналина — L-ДОФА, предупреждающий истощение запасов норадреналина внутренних органов при чрезвычайных воздействиях на организм [6].

С этой целью L-ДОФА вводили одной группе кроликов в дозе 10 мг/кг внутривентриально дважды: перед стимуляцией и за 1 ч до ее окончания.



Содержание норадреналина (в мкг на 1 г влажной ткани) в миокарде кроликов при электростимуляции дуги аорты.

А — после электростимуляции дуги аорты: 1 — после 15 мин стимуляции (14 кроликов), 2 — после 3 ч стимуляции (20 кроликов), 3 — через 48 ч после 3-часовой стимуляции (20 кроликов); Б — после электростимуляции дуги аорты при введении L-ДОФА: 1 — перед 3-часовой стимуляцией (10 кроликов); 2 — после 3-часовой стимуляции (10 кроликов); а — контроль; б — после стимуляции; в — при введении L-ДОФА.

Принятая в наших опытах доза L-ДОФА 10 мг/кг является минимальной дозой, предупреждающей снижение содержания норадреналина в тканях внутренних органов при нейрогенном повреждении, не уступающей по эффекту дозе 50 мг/кг [6]. Другой группе животных L-ДОФА вводили после прекращения 3-часовой стимуляции в течение 48 ч 4 раза в той же дозе. Контролем к каждой группе служили интактные кролики.

Результаты исследований показали, что введение L-ДОФА предупреждало истощение запасов тканевого норадреналина, вызываемое электростимуляцией дуги аорты (см. рисунок). Аналогичные результаты были получены при применении L-ДОФА на фоне истощения тканевых запасов норадреналина, содержание которого полностью восстанавливалось до нормального уровня. Если через 48 ч после стимуляции дуги аорты содержание норадреналина в миокарде составляло всего $0,10 \pm 0,025$ мкг/г, то после введения ДОФА его уровень достигал $0,42 \pm 0,05$ мкг/г, что соответствовало его содержанию у интактных животных — $0,4 \pm 0,035$ мкг на 1 г влажной ткани (см. рисунок). Восстановление содержания норадреналина с помощью L-ДОФА предупреждает развитие нейрогенных повреждений миокарда [2]. Эти экспериментальные данные нашли подтверждение в клинической практике. Применение L-ДОФА у больных при оперативных вмешательствах на сердце нормализовало уровень норадреналина и ультраструктуру в биоптатах миокарда [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Аничков С. В., Заводская И. С., Морева Е. В., и др. Нейрогенные дистрофии и их фармакотерапия. Л., 1969. — 2. Аничков С. В., Новикова Н. А., Исаченко В. Б. и др. — Пат. физиол., 1974, № 2, с. 50—54. — 3. Заводская И. С., Морева Е. В. — Кардиология, 1968, № 7, с. 73—76. — 4. Меерсон Ф. З., Гомзаков О. А. — Кардиология, 1971, № 9, с. 140—153. — 5. Матлина Э. Ш., Шабанова Т. Б. — В кн.: Методы исследования некоторых систем гуморальной регуляции. М., 1967, с. 136—141. — 6. Аничков С. В., Заводская И. С., Морева Е. В. et al. (Аничков С. В. и др.) — In: Peptic Ulcer. Philadelphia, 1971, p. 307—309. — 7. Заводская И. С., Забродин О. Н., Кучеренко Р. П. и др. — В кн.: Сердечная недостаточность. М., 1975, с. 157—158.

Поступила 23/V 1978 г.

IMPAIRMENTS IN TISSUE NORADRENALINE CONTENT IN RABBIT MYOCARDIUM, CAUSED BY ELECTROSTIMULATION OF AORTIC ARCH

N. A. Novikova

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

Excessive stimulation of reflexogenic zone of rabbit aortic arch resulted in impairments of noradrenaline tissue reserves in heart muscle. Administration of one of the precursors of noradrenaline l-DOPA not only prevented the decrease in tissue noradrenaline content in myocardium, but restored completely its reserves, exhausted by electrostimulation of the aortic arch.

УДК 617-001.17-092.9-085.357.631.017:615.272.6-07:[616-008.939.6+616-008.939.15]-07

Ю. А. Богдарин

ВЛИЯНИЕ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛКОВОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Горьковский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии

Обжог 20% поверхности кожи у крыс вызывает снижение содержания в крови альбуминов и γ -глобулинов при одновременном увеличении содержания α_1 - и α_2 -глобулинов. В крови и печени обожженных животных снижается содержание $S_{17:1}$ и $S_{19:1}$ моноено-

вых жирных кислот. Введение этим животным нероболила в дозе 5 мг/кг нормализует указанные показатели. Нанесение ожога кастрированным крысам-самцам приводит к снижению концентрации альбуминов, α_1 - и α_2 -глобулинов в крови при одновременном увеличении содержания моноеновых жирных кислот в крови и печени. Введение нероболила в дозе 20 мг/кг нормализует эти показатели, тогда как доза 5 мг/кг значительно менее эффективна.

Несмотря на широкое применение анаболических стероидных гормонов для лечения заболеваний, связанных с нарушением белкового обмена, механизм их действия все еще изучен мало. В первую очередь это относится к вопросу о связи между аминокислотами и высшими жирными кислотами (ВЖК) на этапах их биосинтеза. Возможно, что известные изменения в жировом обмене, в частности в составе ВЖК у животных, получивших половые гормоны [1], в определенной степени связаны с обеспечением анаболических процессов белкового обмена [2]. Вероятность такого предположения может быть обоснована установленными в опытах на здоровых животных фактами, свидетельствующими об активации андрогенами и их синтетическими аналогами синтеза белка одновременно с усилением мобилизации и окисления жира [3, 4].

В связи с изложенным выше возникает необходимость изучения действия андрогенов и их синтетических аналогов на показатели белкового и липидного обмена при заболеваниях, протекающих с наиболее выраженными изменениями последнего.

В настоящем исследовании было изучено действие андрогенов и нероболила на белковый спектр крови и состав ВЖК крови и печени обожженных крыс.

М е т о д и к а

Работа выполнена на 66 крысах-самцах массой 190—230 г. Животные были разделены на 7 групп: 1-я — интактные крысы; 2-я — крысы с ожогами; 3-я — крысы с ожогами, получившие нероболил (5 мг на 1 кг массы); 4-я — кастрированные крысы; 5-я — кастрированные крысы с ожогами; 6-я — кастрированные крысы с ожогами, получившими нероболил (5 мг/кг); 7-я — кастрированные крысы с ожогами, получившими нероболил (20 мг/кг). Все животные получали воду и стандартную диету, содержащую хлеб, молоко, сырые свеклу и картофель. Кастрированных самцов использовали не раньше чем через 20 сут после операций. Стандартные ожоги III—IV степени на площади 20% поверхности тела в области спины крыс вызывали при температуре 250°C, время экспозиции 10 с. Нероболил вводили внутримышечно в масле сразу после ожога ежедневно. Последнее введение гормона осуществляли за сутки до декапитации животных. Все показатели определяли на 6-е сутки после ожога. Белковые фракции сыворотки крови определяли методом электрофореза на бумаге в боратном буфере pH 8,6. Обработку крови и печени для последующего определения в них ВЖК производили по методу К. М. Синяк и соавт. [5]. Газохроматографическое определение ВЖК осуществляли на хроматографе «Цвет—104» с ионизационно-пламенным детектором. Разделение ВЖК производили в 2-метровых стеклянных колонках (внутренний диаметр 3 мм), заполненных хроматоном N-AW-DMCS (0,125—0,160 мм) +4,5% полидиэтиленгликольсукцината. Рабочий режим изотермический при 170°C. Скорость газа-носителя (азот особой чистоты) 20 мл/мин. Чувствительность усилителя 2·10⁻¹⁰. Идентификацию пиков ВЖК на хроматограммах осуществляли путем их сравнения с пиками стандартов ВЖК (13 кислот), а также по данным литературы. Долю каждой кислоты выражали в процентах к общей сумме ВЖК, принятой за 100%.

Полученные данные обрабатывали статистически по Стьюденту.

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

Результаты исследования представлены в таблице.

В крови крыс после ожога наблюдалась диспротеинемия, выражающаяся в снижении содержания альбуминов, γ -глобулинов и повышении α_1 - и α_2 -глобулинов. У этих же животных в крови и в печени уменьшалось содержание гептадеценовой (C_{17:1}) и нонадеценовой (C_{19:1}) кислот. При введении нероболила обожженным крысам увеличивалось количество альбуминов и уровень C_{17:1} и C_{19:1} кислот в крови и в печени до исходного, а содержание C_{19:1} кислоты в крови даже превосходило исходное.

Содержание белковых фракций в крови и высших жирных кислот в крови и печени обожженных крыс

Белковые фракции крови, г на 100 мл:	Число животных	Группа животных						
		1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я
Альбумины	13	2,73±0,06	1,90±0,18*	2,33±0,11	2,04±0,13*	1,77±0,26*	1,76±0,08*	2,48±0,12
глобулины:								
α ₁	9	0,96±0,07	1,13±0,09*	1,05±0,09	1,06±0,10	0,73±0,10	0,84±0,07*	1,56±0,17*
α ₂	9	0,77±0,05	0,99±0,13*	0,86±0,07	1,00±0,12*	0,66±0,07*	0,66±0,05*	1,31±0,27*
β	9	1,18±0,11	1,13±0,19	1,12±0,13	1,22±0,10	0,82±0,04*	0,88±0,10*	0,49±0,06*
γ	10	1,24±0,11	0,97±0,12*	1,24±0,09	1,14±0,09	1,89±0,16*	2,07±0,17*	1,53±0,18*
Высшие жирные кислоты, %, %:								
C _{15:1}	9	2,17±0,21	1,95±0,10	2,12±0,10	1,72±0,16*	4,75±0,37*	6,18±0,31*	3,41±0,30*
кровь	9	1,16±0,06	0,92±0,13	1,44±0,13	1,42±0,13	2,42±0,25*	1,17±0,20	0,57±0,05*
печень								
C _{17:1}	9	1,75±0,17	0,82±0,06*	1,91±0,09	1,41±0,10	4,99±0,65*	8,27±0,42*	2,66±0,47*
кровь	9	1,23±0,08	0,95±0,16*	1,33±0,21	1,32±0,14	3,02±0,57*	0,79±0,18*	0,71±0,20*
печень								
C _{19:1}	9	1,20±0,32	—	1,97±0,14	—	1,11±0,12*	1,33±0,14*	0,80±0,17*
кровь	9	0,80±0,11	—	0,86±0,08*	1,20±0,18*	2,07±0,10*	1,05±0,24	0,60±0,14*
печень								

* $P < 0,05$ — достоверное отличие от исходных величин.

Кастрация приводила к уменьшению концентрации альбуминов, а в составе ВЖК крови выявлялась тенденция к уменьшению C_{17:1} кислоты и уменьшение содержания пентадециновой (C_{15:1} кислоты. В то же время в печени увеличивалось содержание C_{19:1} кислоты. Незначительные изменения в составе белковых фракций крови и минорных моноеновых ВЖК с печетным числом атомов углерода (мононенасыщенные ВЖК) у кастрированных крыс становятся выраженными, если у этих животных вызвать стрессорную реакцию.

Так, стрессорная реакция на ожог на фоне кастрации сопровождалась выраженным снижением содержания в крови альбуминов и в отличие от обожженных некастрированных животных уменьшением количества α₁-, α₂- и β-глобулинов. Значительные изменения отмечались и в составе ВЖК крови, где определялась высокая концентрация C_{15:1}, C_{17:1} и C_{19:1} кислот. Сходные изменения содержания указанных кислот происходили и в печени, но в несколько меньшей степени, чем в крови. Введение пероболрила кастрированным обожженным крысам в дозе 5 мг/кг вызывало лишь увеличение количества γ-глобулинов, но не влияло на содержание других белковых фракций. В составе ВЖК печени наблюдалось уменьшение уровня C_{15:1}, C_{17:1} и C_{19:1} кислот, в то время как в крови их содержание продолжало оставаться высоким. Введение пероболрила в дозе 20 мг/кг позволило получить у кастрированных обожженных крыс не только увеличение альбу-

минов, по и снижение содержания $C_{15:1}$, $C_{17:1}$ и $C_{19:1}$ кислот и в печени, и в крови (см. таблицу).

Полученные нами данные об уменьшении содержания альбуминов и повышении α_1 и α_2 -глобулинов при ожогах у крыс в раннем периоде (токсемия) согласуются с данными литературы [6—8]. Ф. Х. Камиллов [9] связывает это увеличение α_1 и α_2 -глобулинов с усилением их синтеза. Известно, что на биосинтез белка при патологии расходуется большое количество энергии и пластического материала, источником которых служат ВЖК [10]. Уменьшение содержания $C_{15:1}$, $C_{17:1}$ и $C_{19:1}$ кислот в крови и печени у обожженных крыс в наших опытах, возможно, связано с их усиленной утилизацией.

С целью повышения уровня белков в крови обожженных животных мы использовали кратковременное и непрерывное введение одного из синтетических стероидов, обладающих наряду с анаболическими свойствами и липолитической активностью [11].

Повышение содержания белков в крови обожженных крыс и людей после введения анаболических стероидов подтверждено результатами многочисленных исследований [12, 13]. Применение пероболила приводило в наших опытах не только к повышению содержания альбуминов, но и к нормализации уровня моноеновых ВЖК с четным числом атомов углерода в крови и печени обожженных крыс.

Подтверждением участия анаболических стероидных гормонов в регуляции белкового и липидного обмена при ожогах явились результаты, полученные нами на кастрированных обожженных самцах, получавших пероболил.

Возможно, что доза пероболила 5 мг/кг у кастрированных обожженных крыс оказывается недостаточной для нормализации обмена моноенасыщенных ВЖК и белков. Однако и в этом случае пероболил способствовал снижению уровня моноенасыщенных ВЖК в печени, что предполагает его действие на этот важнейший орган, ответственный за метаболизм белков и жиров. Увеличение дозы пероболила до 20 мг/кг, приводящее к снижению содержания моноенасыщенных ВЖК как в печени, так и в крови, подтвердило способность данного анаболического стероида нормализовать биосинтез белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Flamigni C., Bovicelli L., Tirelli R. et al. — *Attual. Ostet. Ginec.*, 1967, v. 13, Suppl. 2, p. 456. — 2. Dathan D. G., Cahill G. F., Gardner F. H. — *Metabolism*, 1963, v. 12, p. 850. — 3. Абдулаев Н. Х. — *Пробл. эндокринолог.*, 1965, № 1, с. 102. — 4. Зарубина Н. А., Балаболкин М. Н. — В кн.: *Стероидные гормоны в клинической и экспериментальной патологии*. М., 1966, с. 131. — 5. Сияк К. М., Оргель М. Я., Крук В. И. — *Лабор. дело*, 1976, № 1, с. 37. — 6. Пилушин П. В. — В кн.: *Ожоги, патогенез, клиника, лечение* (Труды ВМОЛА, т. 142, Л., 1962, с. 68—7. Белопольский А. А. — *Пат. физиол.*, 1972, № 4, с. 65. — 8. Tubiana R., Alive G., Vaux S. et al. — In: *Research in Burns*. (International Congress). Edinburgh, 1966, p. 92. — 9. Камиллов Ф. Х. — В кн.: *Вопросы биохимии ожоговой травмы*. Челябинск, 1973, с. 6. — 10. Абдулаев Н. Х. — *Пробл. эндокринолог.*, 1966, № 4, с. 106. — 11. Лагон Л., Ковалю А. — *Metabolism*, 1963, v. 12, p. 588. — 12. Матте Ф., Ткач А. — *Венгерск. мед.*, 1967, № 23, с. 29. — 13. Анищенко Л. Г. — В кн.: *Ожоги*. (1-я Донецкая научно-практическая конф.). Донецк, 1966, с. 8.

Поступила 23/V 1978 г.

EFFECT OF ANABOLIC STEROID HORMONES ON THE PATTERNS OF PROTEIN AND LIPID METABOLISM IN THERMIC BURNS

Yu. A. Bogdarin

Institute of Traumatology and Orthopedics, Gorki

Burns of 20% of rat skin caused a decrease in content of albumins and γ -globulins in blood and simultaneous increase in content of α_1 - and α_2 -globulins. Content of $C_{17:1}$ and $C_{19:1}$ monoenoic fatty acids was decreased in blood and liver tissue of the rats with

burns. These patterns were normalized after administration into the animals of synthetic anabolic steroid nerobolyl at a dose 5 mg/kg. Burning of castrated male rats led to a decrease in concentration of albumins, α_1 - and α_2 -globulins in blood with simultaneous increase of monoenoic fatty acids in blood and liver tissue. Nerobolyl normalized these patterns at a dose 20 mg/kg, while a dose 5 mg/kg was distinctly less effective.

УДК 616.153.963.32-074

В. К. Подгородниченко, Л. М. Цыпляковская, А. С. Саенко,
Л. Е. Брыксина, А. М. Поверенный

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ДНК-СВЯЗЫВАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ В УСЛОВИЯХ НИЗКОЙ ИОННОЙ СИЛЫ

Научно-исследовательский институт медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск

Результаты определения взаимодействия сывороточных белков с нативной ДНК при низкой ионной силе (0,05 М NaCl и 0,015 М цитрат натрия) методом адсорбции комплекса ДНК—белок на нитроцеллюлозных фильтрах зависят от удельной активности, молекулярной массы ДНК и количества взятых в реакцию ДНК и сыворотки. Определение ДНК-связывающей активности сывороток крови больных следует проводить при таких соотношениях компонентов, при которых сыворотки крови здоровых людей адсорбируют ДНК в минимальных количествах. В качестве параметра, регулирующего степень связывания ДНК фильтрами, наиболее предпочтительно использовать сыворотку, беря в реакцию смесь такое ее количество, которое соответствует максимальному количеству сыворотки крови здоровых людей, не адсорбирующему данный препарат ДНК.

Принято считать, что способностью реагировать с нативной ДНК (нДНК) обладают в основном сыворотки крови больных системной красной волчанкой (СКВ). Однако при снижении ионной силы с нДНК начинают взаимодействовать белки сывороток крови больных с другими заболеваниями и практически здоровых людей [1]. Ранее было установлено, что в условиях низкой ионной силы (0,05 М NaCl и 0,015 М цитрат натрия) с нДНК реагируют сыворотки крови больных с различными заболеваниями, а связывание ДНК сыворотками крови здоровых людей незначительно [2]. Уровень ДНК-связывающей активности у больных, коррелирующий с интенсивностью воспалительного процесса, может быть использован в целях диагностики [2].

Способность сывороток крови больных взаимодействовать с ДНК, по-видимому, обусловлена увеличением содержания ДНК-связывающих белков, присутствующих, возможно, и в сыворотках крови здоровых людей. Известно, что уровень ДНК-связывающей активности при использовании метода, основанного на адсорбции комплекса ДНК—белок на нитроцеллюлозных фильтрах, зависит от молекулярной массы ДНК и количества взятых в реакцию сыворотки и ДНК. Кроме того, поскольку в пробу принято вносить определенное количество импульсов, а не массы ДНК, то получаемые результаты зависят и от удельной активности ДНК [3, 4]. Так как молекулярная масса ДНК зависит от способа выделения и, следовательно, является величиной переменной, результаты определения ДНК-связывающей активности сывороток крови больных и здоровых людей могут варьировать. Из чисто формальных соображений очевидно, что для оценки ДНК-связывающей активности наиболее целесообразны такие условия постановки реакции, при которых сыворотки крови больных людей взаимодействуют с ДНК, а сыворотки крови здоровых такой способностью не обладают. В настоящей работе проведена подробная количественная оценка влияния условий реакции на определение ДНК-связывающей активности сывороток крови здоровых и больных людей.

Методы исследования

Сыворотки крови больных коллагенозами получены из Института ревматизма АМН СССР, Москва. ДНК-связывающую активность сывороток определяли, как описано в работе [1]. К различным количествам сыворотки крови людей добавляли 900 мкл раствора, содержащего 0,05 М NaCl, 0,015 М трехзамещенного цитрата натрия и 0,003 М трис-буфера, рН 8,0. В ряде исследований использовали буферный раствор такого же состава с более высокой ионной силой за счет увеличения концентрации NaCl до 0,15 М. После добавления в пробу [³H]-ДНК смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C и 15 мин при 4°C и наносили на нитроцеллюлозные фильтры. Общий объем реакционной смеси составлял 1 мл. Радиоактивность определяли в сцинтилляционном счетчике SL30, Intertechnique (Франция). Меченую ДНК получали из клеток *E. coli*, выращенных в присутствии [³H]-тимидина по методу Мармура [5]. Удельная активность препарата составляла 25 000 имп/(мин/мкг). Центрифугирование ДНК в градиенте плотности сахарозы проводили, как описано в работе [6]. Расчет среднечисленной молекулярной массы ДНК произведен по формуле, предложенной Студиером [7]. Хроматографию на колонке с сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция) производили, как описано в работе [1]. Для разрушения ДНК использовали ультразвуковой дезинтегратор «ARTEK» (Fischer Sci Co, США) мощностью 100 Вт при 60% мощности.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что более высокомолекулярная ДНК, полученная из первого пика при хроматографии на колонке с сефарозой 4В, адсорбируется на нитроцеллюлозных фильтрах после взаимодействия с антителами в большем количестве, чем исходная [3]. Очевидно, что большая реакционная способность ДНК обусловлена удалением низкомолекулярной фракции ДНК. Поэтому хроматография на колонке с сефарозой может служить одним из приемов, позволяющих получать стандартные препараты ДНК для определения ДНК-связывающей активности сывороток. Это предположение проверено методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. На рис. 1 представлены седиментационные профили (³H)-ДНК до и после пропускания через сефарозу 4В. На рис. 1 видно, что после хроматографии препараты ДНК становятся более гомогенными по молекулярной массе за счет удаления низкомолекулярных фрагментов. Однако такая ДНК частично адсорбируется на фильтрах в отсутствие сывороток. Предварительное пропускание препаратов ДНК через нитроцеллюлозные фильтры значительно снижает неспецифическую сорбцию радиоактивности. Как видно из седиментограммы на рис. 1, после хроматографии на нитроцеллюлозных фильтрах из препарата ДНК удаляется наиболее высокомолекулярная ДНК. Среднечисленная молекулярная масса ДНК до пропускания через фильтры составляла $29 \cdot 10^6$, после — $13 \cdot 10^6$. Очевидно, что в выделенной ДНК наиболее высокомолекулярная ее часть содержит связанный белок, либо такая ДНК частично денатурирована. В связи с этим ДНК осаждается на фильтрах в отсутствие сывороток.

При определении ДНК-связывающей активности наиболее часто в реакцию берут 100 мкл сыворотки [1, 8]. Сыворотки крови здоровых людей в таких количествах связывают ДНК с удельной активностью 10 000—15 000 имп/мин на 1 мкг не более 15% от внесенной в пробу.

На рис. 2 представлены результаты взаимодействия 100 мкл сывороток крови больных СКВ и здоровых людей с ДНК различной молекулярной массы с удельной активностью 25 000 имп/мин на 1 мкг. Как видно на рис. 2, с исходной ДНК с молекулярной массой $13 \cdot 10^6$ взаимодействуют сыворотки крови как здоровых, так и больных людей. Уменьшение молекулярной массы ДНК резко сказывается на величине ДНК-связывающей активности сывороток крови здоровых людей. С ДНК с молекулярной массой $1,5 \cdot 10^6$ (озвучивание 5 с) сыворотки крови здоровых людей практически не реагируют. ДНК-связывающая активность сывороток крови больных также снижается, но превышает таковую здоровых людей. Уменьшение молекулярной массы ДНК до $0,9 \cdot 10^6$ (озвучивание 10 с) снижает способность ДНК

связываться с сыворотками крови больных коллагенозами и некоторых больных СКВ. В ряде случаев ДНК-связывающая активность сывороток крови больных СКВ изменяется незначительно. При сопоставлении результатов определения ДНК-связывающей активности сывороток крови больных СКВ с использованием 0,15 и 0,05 М NaCl обнаружено, что уменьшение молекулярной массы ДНК слабо влияет на взаимодействие с теми сыворотками крови, которые обладают высокой ДНК-связывающей активностью при ионной силе физиологического раствора, т. е. содержат антитела к ДНК.

Поскольку процент связывания ДНК сыворотками зависит от количества сыворотки, взятой в реакцию [9, 10], этот прием можно использовать в

% общей радиоактивности

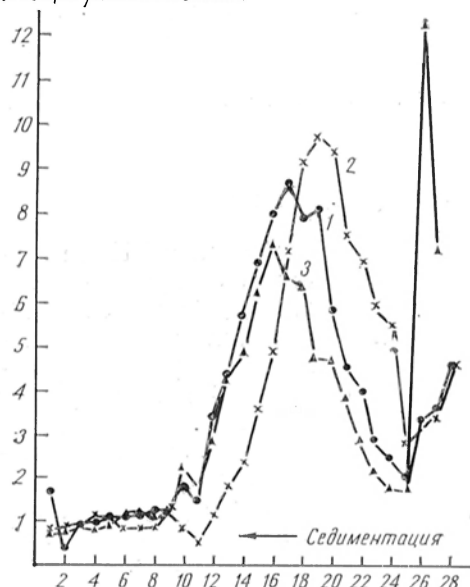


Рис. 1. Седиментограммы ДНК в градиентах нейтральной сахарозы 5—20%.

По оси абсцисс — номер фракций; по оси ординат — процент радиоактивности.

1 — препарат ДНК после хроматографии на колонке с сефарозой 4В; 2 — тот же препарат после пропускания через нитроцеллюлозные фильтры; 3 — исходный препарат ДНК, выделенный из Е.

% связывания ДНК

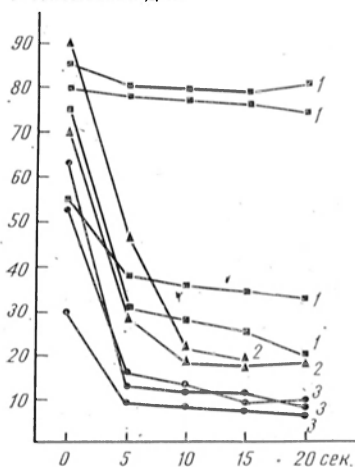


Рис. 2. Зависимость между молекулярной массой ДНК и ее способностью взаимодействовать с различными сыворотками крови больных СКВ (1), другими коллагенозами (2), и здоровых людей (3).

По оси абсцисс — время обработки ДНК ультразвуком (в с); по оси ординат — процент связывания 0,04 мкг ДНК 100 мкл сыворотки.

качестве параметра, регулирующего чувствительность реакции. На рис. 3 представлены результаты исследования взаимосвязи между количеством сывороток крови здоровых и больных СКВ людей и связыванием ДНК. На рис. 3, а видно, что ДНК-связывающая активность сывороток крови здоровых людей резко падает при уменьшении количества сыворотки крови в пробе до 10 мкл. Все сыворотки крови больных СКВ и большинство сывороток крови больных другими коллагенозами взаимодействуют с ДНК при внесении их в пробу в количествах значительно меньших, чем 10 мкл (см. рис. 3, б, в). Следует отметить, что при внесении в пробу более 100 мкл сыворотки адсорбция ДНК фильтрами снижается. Очевидно, большие концентрации сыворотки крови препятствуют осаждению комплекса ДНК — белок на фильтрах.

Чувствительность метода определения ДНК-связывающей активности в низкой ионной силе зависит от количества добавленной в пробу ДНК. С увеличением количества ДНК в пробе процент связывания ДНК сыворотками крови здоровых людей снижается (рис. 4).

Итак, высокомолекулярная ДНК ($13 \cdot 10^6$) с удельной активностью 25 000 имп/мин на 1 мкг связывается 100 мкл сыворотки крови как больных,

так и здоровых людей при ионной силе, соответствующей 0,05 М NaCl. Это явление обусловлено, видимо, тем обстоятельством, что при таких условиях реакции определяются реагирующие с ДНК белки, которые присутствуют в сыворотках крови здоровых людей.

Как следует из представленных результатов, используя препараты ДНК с различной молекулярной массой, добавляя разное количество ДНК или сыворотки крови в пробу, можно добиться того, что при определенных

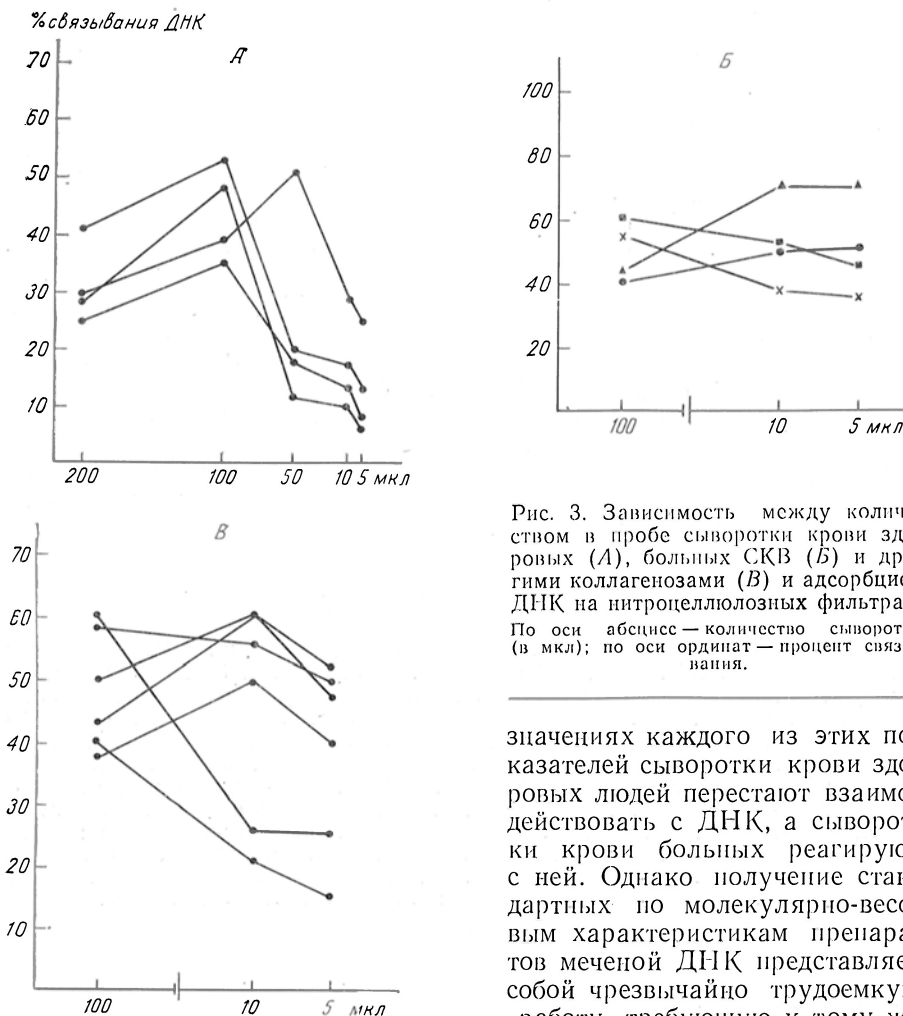


Рис. 3. Зависимость между количеством в пробе сыворотки крови здоровых (А), больных СКВ (Б) и другими коллагенозами (В) и адсорбцией ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах. По оси абсцисс — количество сыворотки (в мл); по оси ординат — процент связывания.

значениях каждого из этих показателей сыворотки крови здоровых людей перестают взаимодействовать с ДНК, а сыворотки крови больных реагируют с ней. Однако получение стандартных по молекулярно-весовым характеристикам препаратов меченой ДНК представляет собой чрезвычайно трудоемкую работу, требующую к тому же дорогостоящего оборудования.

Поэтому для практики клинических исследований выделение ДНК с определенной молекулярной массой применять нецелесообразно.

Из представленных результатов ясно, что в 100 мкл большинства сывороток крови здоровых людей присутствует такое количество белка, которое способно связать около 0,1 мкг ДНК и для снижения фона необходимо добавлять ~0,5 мкг ДНК либо уменьшать количество сыворотки в пробе до 10 мкл. Очевидно, что увеличение в 2—3 раза содержания ДНК-связывающих белков в 100 мкл сыворотки (больные) не меняет существенно связывания ДНК по сравнению со здоровыми (см. рис. 3), в то время как при использовании 10 мкл сыворотки разница между больными и здоровыми будет отчетливо выявляться.

Другим фактором, регулирующим чувствительность реакции, является изменение молекулярной массы ДНК, уменьшая которую, можно добиться

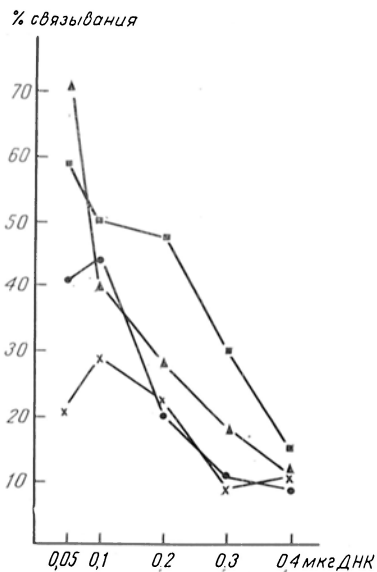


Рис. 4. Зависимость между количеством ДНК в пробе и адсорбцией ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах в присутствии 100 мкл сыворотки здоровых людей.

По оси абсцисс — количество ДНК (в мкг); по оси ординат — процент связывания.

состояния, когда сыворотки крови здоровых людей перестают взаимодействовать, а больных — продолжают. Однако поскольку изменение количества сыворотки является более простым приемом и, кроме того, позволяет не только уменьшать, но и увеличивать до определенных значений чувствительность реакции, этот прием более предпочтителен.

Представляют интерес данные о том, что некоторые сыворотки крови больных СКВ в условиях низкой ионной силы продолжают взаимодействовать и адсорбировать ДНК в отличие от здоровых, несмотря на уменьшение молекулярной массы ДНК. Показано, что такой способностью обладают сыворотки, реагирующие с ДНК в условиях ионной силы физиологического раствора. Эти данные позволяют заключить, что низкомолекулярная ДНК также может быть использована для определения антител к ДНК в сыворотках крови больных СКВ при условии снижения ионной силы реакционной среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поверенный А. М., Подгородниченко В. К., Цыпляковская Л. М. и др. — Мол. биол., 1975, № 6, с. 828.
2. Поверенный А. М., Цыпляковская Л. М., Бойчук В. В. и др. — Тер. арх., 1976, № 9, с. 123.
3. Цыпляковская Л. М., Бойчук В. В., Сидорова Н. М. и др. — Сов. мед., 1976, № 7, с. 29.
4. Kredich N. M., Skyleg J. S., Foote L. J., — Arch. intern. Med., 1973, v. 131, p. 639.
5. Margur J. — J. molec. Biol., 1961, v. 3, p. 208.
6. Burgi E., Hershey A. D. — Biophys. J., 1963, v. 3, p. 309.
7. Studier F. W. — J. molec. Biol., 1965, v. 11, p. 373.
8. Алекберова З. С., Цыпляковская Л. М., Подгородниченко В. К. и др. — Тер. арх., 1974, № 11, с. 82.
9. Young B. J. — Med. Lab. Sci., 1976, v. 33, p. 167.
10. Holian J., Griffiths I. D., Glass D. N. et al. — Ann. rheum. Dis., 1975, v. 34, p. 438.

Поступила 14/II 1978 г.

FACTORS, AFFECTING THE DNA-BINDING PROPERTIES OF HUMAN BLOOD SERUM UNDER NORMAL AND PATHOLOGICAL STATES AT LOW IONIC STRENGTH

V. K. Podgorodnichenko, L. M. Tsypliyakovskaya, A. S. Saenko, L. E. Bryskina, A. M. Poverenny

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

Interaction of blood serum proteins with native DNA at low ionic strength (0.05 M NaCl and 0.015 M sodium citrate), estimated by adsorption of DNA-protein complex on nitrocellulose filters, depended on specific activity, molecular weight of DNA as well as on the amount of DNA and blood serum in the samples. DNA-binding activity of blood serum from the patients should be estimated at such ratio of components, when the blood serum from healthy persons adsorbed minimal quantities of DNA, since the molecular weight and specific activity of the DNA preparations might vary in various samples. As a factor, regulating the rate of DNA binding on filters, such amount of blood serum from patients should be added to the samples, which corresponded to the maximal amount of normal blood serum causing no binding with the DNA preparations.

Л. С. Минина

ОТБОР ПРЕПАРАТОВ С ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ АНТИЭСТРОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Всероссийский научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии, Москва

Определено средство в соединениях ряда эстрадиол к рецепторным системам матки и яйцеводов морских свинок. Выявлена тканевая специфика взаимодействия рецепторных систем указанных органов-мишеней с изученными соединениями. На основании анализа средства исследованных в настоящей и предыдущих работах соединений отобран препарат — 17 α -этилэстрадиол с предполагаемой антиэстрогенной активностью.

Установлено, что стероидные гормоны, в том числе эстрогены, осуществляют свое биологическое действие путем комплексообразования с цитоплазматическими белковыми рецепторами [1]. Образовавшийся эстроген-рецепторный комплекс, проникая в ядра и взаимодействуя с хроматином, стимулирует процессы трансляции генетической информации, что приводит к синтезу нуклеиновых кислот, белков и клеточному делению [2].

Поиск препаратов, вызывающих эстрогенный или антиэстрогенный эффект, который может осуществляться через блокаду рецепторных систем органов-мишеней, диктуется интересами клиники. Этот поиск в настоящее время может стать направленным, так как накопился определенный литературный материал о закономерностях корреляции химической структуры препаратов и их биологического действия.

Исследования, проведенные как в нашей [3,4], так и в ряде зарубежных лабораторий [5, 6], позволили сформулировать основные закономерности взаимодействия эстрогенов с эстроген-рецепторными системами органов-мишеней. Показано, что для активного эстрогенного действия молекула стероида должна иметь два гидроксильных (в 3-м фенольном и 17 β -положении), как в эстрадиоле. Соединения с модификацией или удалением одной из гидроксильных групп обладают достаточно высоким средством к эстрогенным рецепторам матки, в то время как их биологическая активность низка [7, 8]. Предположение о том, что соединения такого рода могут давать антиэстрогенный эффект, представляется вполне вероятным.

Цель настоящей работы — дальнейшая характеристика и отбор из соединений с модифицированным 3-м или 17 β -гидроксильными препаратами с заметным средством к эстроген-рецепторным системам органов-мишеней с целью выявления потенциальных антиэстрогенов.

Методы исследования

Исследованные препараты — диацетат — 17 α -этинилэстрадиола, 17 α -этилэстрадиол, 17 β -ацетат-17 α -этинилэстрадиол, диацетат этинилэстрадиола, триметил-, 2- и 4-силлилэстрадиола — были любезно предоставлены канд. хим. наук Г. С. Гриненко (лаборатория гормональных стероидов ВНИХФИ) и канд. хим. наук К. К. Пивницким (лаборатория химии стероидных гормонов ИЭЭ и ХГ АМН СССР). Оценку средства указанных препаратов производили по отношению к эстрадиол-связывающим системам цитозолов маток и яйцеводов морских свинок, так как предыдущими работами лаборатории было продемонстрировано значительное сходство основных параметров эстроген-рецепторного взаимодействия указанных систем с таковыми человека [3, 4]. Для характеристики средства ряда эстрогенных препаратов использовали ранее описанный метод [4], основанный на принципе насыщающего анализа [9]. В работе использовали ткани двух органов-мишеней для выявления возможных различий в эстроген-рецепторном взаимодействии в матках и яйцеводах.

Результаты и обсуждение

Полученные данные представлены в таблице в виде молярных процентов средства к использованным рецепторным системам. Процент средства вычисляли по отношению к средству эстрадиола, принятому за 100%.

Как видно из таблицы, исследованные соединения обладают довольно низким сродством к эстроген-чувствительным системам указанных органов-мишеней. Имеются достоверные различия в сродстве ряда эстрогенов к эстроген-рецепторным системам маток и яйцеводов.

Данные таблицы также с убедительностью доказывают корреляцию между структурой соединения и способностью связываться с эстроген-чувствительными системами.

Сродство стероидов ряда эстрана к эстроген-рецепторным системам маток и яйцеводов морских свинок

№ п/п	Соединение	Процент сродства по отношению к сродству эстрадиола (100%), $M \pm m$		P
		матка (n = 6)	яйцеводы (n = 6)	
1	Диацетат-этинилэстрадиола	.367 ± .041	.187 ± .026	< .005
2	17α-этилэстрадиол	.587 ± .024	1.144 ± .044	< .0005
3	17β-ацетат-17α-этинилэстрадиол	1.584 ± .079	.543 ± .060	< .0005
4	Триметил, 4-силлилэстрадиол	.725 ± .022	.479 ± .032	Нет достоверных различий
5	Диацетат эстрадиола	1.895 ± .039	1.522 ± .147	< .025
6	Триметил, 2-силлилэстрадиол	.068 ± .008	.080 ± .009	Нет достоверных различий

вительными системами (роль отдельных функциональных групп эстрогеновой молекулы в эстроген-рецепторном взаимодействии).

Влияние этильной группы на 17β-гидроксил значительно снижает связывание эстрогена рецепторными молекулами (соединение 2). В этом случае сродство препарата практически равно сродству соединения с восстановленным 17β-гидроксилом (17-дезоксистероидом) [4].

Ацетилирование одного или двух гидроксильных групп пропорционально снижает сродство стероидов (соединения 1, 3, 5) по сравнению с исходными соединениями (эстрадиолом и 17α-этинилэстрадиолом) [4].

Соединения 2, 4, 6, по-видимому, взаимодействуют с рецепторами только благодаря связыванию с одной из гидроксильных групп. Можно предположить, что эти соединения обладают антиэстрогенными свойствами. По данным литературы, комплекс аналогичного соединения с цитоплазматическими рецепторами не транслоцируется в ядро клетки [10]. Стадия же транслокации необходима для создания биологического ответа на экзогенный стероид. С другой стороны, сохранение способности образовывать в цитоплазме эстроген-рецепторный комплекс препятствует (в связи с блокадой эстроген-рецептирующих участков) проявлению эстрогенного эффекта эндогенного эстрадиола.

В связи с изложенными и литературными данными [3, 11, 12] следует отметить, что наиболее перспективным в качестве антиэстрогенного препарата (из изученных в данной работе) может быть 17α-этилэстрадиол, так как этилирование 17α-положения вызывает эффект, подобный восстановлению 17β-гидроксила в эстрадиольной молекуле (17-дезоксистероидом), а стойкость препарата не вызывает сомнения. В то же время, соединение 4 (см. таблицу) с аналогичным этилэстрадиолу сродством является недостаточно стойким, способным гидролизироваться в организме до эстрогенов, обладающих высоким сродством к эстроген-рецепторным системам органов-мишеней.

Исследование сродства вышеназванных соединений к эстроген-рецепторным системам матки и яйцеводов морских свинок предполагает возможность тканевой специфичности в эстроген-рецепторном взаимодействии.

Действительно, хотя выявлен ряд препаратов [4, 6] (см. таблицу), идентично взаимодействующих с рецепторными системами обеих тканей,

четко дифференцируются еще две группы соединений, одна из которых обладает большим сродством к рецепторной системе матки (соединения 1, 3, 5), а другая — к рецепторной системе яйцеводов (соединение 2). Наличие тканевой специфики в связывании изученных соединений позволяет предположить возможность отбора препаратов с преимущественно локальным действием на определенный орган-мишень, что сможет в дальнейшем создать предпосылки к направленной терапии.

Работа выполнена по планам и с финансовой поддержкой Расширенной программы ВОЗ по репродукции человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jensen E. V., DeSombre E. R. — Science, 1973, v. 182, p. 126. —
2. Gorski J., Gannon M. — Rev. Physiol., 1976, v. 38, p. 425. —
3. Персианинов Л. С., Стурчак С. В., Коколина В. Ф. — Труды 2-го Московского мед. ин-та, 1976, т. 51, серия «Хирургия», вып. 12, с. 8—4. —
4. Щедрина Р. Н., Стурчак С. В., Боброва Е. Г. и др. — Бюлл. exper. биол., 1976, № 8, с. 989. —
5. Hahnel R., Twaddle E., Ratajczak T. — J. Steroid. Biochem., 1973, v. 4, p. 687. —
6. Jänne O., Kontula K., Vihko R. et al. — Med. Biol., 1975, v. 53, p. 214. —
7. Martucci C., Fishman J. — Steroids, 1976, v. 27, p. 325. —
8. Lan N. C., Katzenellenbogen B. S. — Endocrinology, 1976, v. 98, p. 220. —
9. Rodbard D., Bridson W., Raybord P. L. — J. Lab. clin. Med., 1969, v. 74, p. 770. —
10. Tseng L., Gurpide E. — J. Steroid. Biochem., 1976, v. 7, p. 817. —
11. Katzenellenbogen B. S., Ferguson E. R. — Endocrinology, 1975, v. 97, p. 1. —
12. Ruh T. S., Ruh M. F. — Steroids, 1974, v. 24, p. 209.

Поступила 9/III 1978 г.

SELECTION OF PREPARATIONS WITH ANTICIPATED ANTIESTROGENIC ACTIVITY

L. S. Minina

All-Union Institute of Obstetrics and Gynecology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Specificity of interaction between estrogen-receptor systems of guinea pig uterus and oviducts and six estrogens was studied. The obtained data suggest existence of tissue specificity in estrogen-receptor interaction in uterus and oviducts. Modifications of the steroid molecule led to decrease in extent of estrogen affinity. Introduction of an ethyl group into 17 α -position resulted in the effect, by the rate of estrogen-receptor binding equal to reduction of 17 β -hydroxyl. Low but distinct affinity of 17 α -estradiol, its structure and stability, enabled to select this substance as a preparation with anticipated anti-estrogenic activity.

УДК 612.396.112.015.3-06:612.826.4

А. А. Галоян, Ж. Г. Абелян, В. В. Баев, Л. П. Тер-Татевосян,
Г. К. Парсадян

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИМ ГЕКСАПЕПТИДОМ НЕКОТОРЫХ ЗВЕНЬЕВ ОБМЕНА ГЛИКОГЕНА

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван; Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Изучено влияние нового гипоталамического гексапептида и его N-ацетилпроизводного на содержание гликогена и активность фосфоорилазы и фосфопротеинфосфатазы (ФПФ-азы) в тканях белых крыс. Через 15 мин после внутривенного введения 1 мкг гексапептида отмечено повышение активности ФПФ-азы сердца на 70%. Вследствие соответствующего перехода фосфоорилазы А (ФА) в фосфоорилазу Б (ФБ) наблюдается заметное накопление гликогена в сердечной мышце. В скелетных мышцах и особенно в печени введение гексапептида приводит к противоположным результатам: подавлению ФПФ-азной активности, увеличению коэффициента ФА/ФБ и снижению содержания гликогена. Заметных сдвигов в активности ФА и ФБ в мозге и почках при введении гексапептида не отмечается. Синтетическое N-ацетилпроизводное гексапептида вызвало более заметные изменения активности ферментов и содержания гликогена в сердечной мышце, чем природный гексапептид.

Ранее было установлено, что нейросекреторные гранулы гипоталамуса различных животных продуцируют не только вазопрессин и окситоцин, но и коронарорасширяющие гормоны, условно названные веществами К и С [1]. Позже было установлено наличие в гипоталамусе в исключительно малых количествах полипептида с кардиотропной активностью [2]. Это вещество, идентифицированное как С-концевой фрагмент люлиберина, является линейным гексапептидом со следующей последовательностью аминокислотной цепи: Тир-Гли-Лей-Арг-Про-Гли- NH_2 . Синтез этого соединения, как и ряда других аналогов люлиберина, осуществлен твердофазным методом в лаборатории акад. Ю. А. Овчинникова [3]. Препарат не обладает токсичностью (будучи природным олигопептидом) и проявляет слабую активность в отношении высвобождения лютропина [3а]. При внутривенном введении кошкам этого гексапептида в дозе 10^{-9} М обнаружено, что он оказывает выраженное коронарорасширяющее действие [2]. Согласно последним данным, гексапептид обладает также свойством оказывать определенное гипогликемическое действие [4]. В настоящем исследовании мы изучили изменения содержания гликогена, а также активность фосфорилазы и фосфопротеинфосфатазы (ФПФ-азы) в различных органах крыс при внутривенном введении нового кардиотропного полипептида гипоталамуса.

М е т о д и к а

В опытах использовали самцов белых крыс линии Вистар массой 150—180 г, содержавшихся на обычном пищевом рационе. Водный раствор гексапептида вводили животным в яремную вену в расчете 1 мкг на животное. Через 15 мин животных декапитуировали, ткани быстро промывали дистиллированной водой на холоду и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в пятикратном объеме ТЭМ-буфера (0,04 М трис — 0,002 М ЭДТА — 0,01 М меркаптоэтанол) рН 6,8. Активность фосфорилазы (КФ 2.4.1.1) определяли по Иллингворту и Кори [5]. При определении фосфорилазной активности гомогенат ткани (0,1 мл) вначале предынкубировали 2 мин при 30°C с 0,1 мл 4% водного раствора гликогена и 0,1 мл ТЭМ-буфера, затем добавляли 0,1 мл 64 мМ глюкозо-1-фосфата (при измерении активности фосфорилазы А) или 0,1 мл 4 мМ раствора 5'-АМФ на 64 мМ глюкозо-1-фосфате (для измерения тотальной фосфорилазной активности). Через 5 мин реакцию останавливали 1,6 мл охлажденной 5% ТХУ. Активность фосфорилазы Б (ФБ) вычисляли по разнице между тотальной фосфорилазной активностью и активностью фосфорилазы А (ФА). Для определения фосфопротеинфосфатазной активности (КФ 3.1.3.16) был использован метод Файнштейна и Фолька [6] с некоторыми модификациями [7]. Количество неорганического фосфата определяли по методу Таусски и Шора [8]. Содержание гликогена в гомогенатах тканей определяли методом Морриса через 30 мин после введения гексапептида [9]. Полученные результаты подвергнуты статистической обработке.

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

В табл. 1 представлены данные о влиянии гипоталамического гексапептида на содержание гликогена в ряде тканей белых крыс. В то время как в сердечной мышце уровень гликогена возрастал на 30%, в печени наблюдалось понижение его содержания после введения гексапептида на 41%. Тенденция к понижению содержания гликогена была характерна также для скелетных мышц. Использование синтетического N-ацетилпроизводного гексапептида привело к более разительным сдвигам. Содержание гликогена в сердечной мышце подопытных животных было на 63% выше, чем в контроле, т. е. абсолютный прирост был вдвое выше, чем при введении природного гексапептида. Гораздо более выраженными были также изменения содержания гликогена в скелетных мышцах (понижение на 44%). Эти данные хорошо коррелируют с полученными ранее фактами, касающимися большей биологической эффективности N-ацетилгексапептида [2]. В то же время ацетилированная форма гормона изменяла количество гликогена в печени в меньшей степени, чем неацетилированная.

Возможно, что различия в содержании гликогена, вызываемые гексапептидом в периферических тканях-мишенях, обусловлены особенностями

в деятельности ферментов, ответственных за поддержание баланса гликогена. Были изучены изменения в соотношении двух форм гликогенфосфорилазы А и Б, катализирующей распад гликогена до глюкозо-1-фосфата (табл. 2). Известно, что фосфорилаза — «неравновесный» регуляторный фермент, активность которого находится под гормональным контролем. Адреналин и глюкогон активируют его, переводя из формы Б в форму А [10].

Наиболее четкие изменения при введении кардиотропного гексапептида обнаружены в сердечной мышце: активность ФА снижается здесь на 36%, а ФБ повышается на 50%.

В результате этого соотношение между активной и неактивной формами фермента уменьшается более чем вдвое. В скелетных мышцах прослеживаются противоположные сдвиги в сторону повышения активности ФА в общем балансе активностей этого фермента. Более значительное увеличение коэффициента ФА/ФБ отмечается в печени (на 80%).

В то же время гексапептид, по-видимому, не оказывает влияния на переход ФА ↔ ФБ в мозге. Нами было изучено также влияние гексапептида на активность фосфорилазы почек. Однако ни в соотношении ФА/ФБ, ни в фосфорилазной активности в целом никаких существенных изменений в течение часа не обнаружено.

Как известно, существуют несколько путей регуляции активности фосфорилазы. В мышцах, например, может наблюдаться ковалентная модифи-

Т а б л и ц а 1

Влияние гексапептида на содержание гликогена (в мг%) в тканях белых крыс (данные 10 опытов)

Исследуемая ткань	Контроль	Форма гексапептида	
		неацетилированная	ацетилированная
Сердце <i>P</i>	211 ± 19,4	276 ± 32,2 <0,15	344 ± 26,4 =0,001
Мышцы <i>P</i>	253 ± 10,3	277 ± 21,0 <0,4	143 ± 18,0 <0,001
Печень <i>P</i>	3421 ± 120,0	2022 ± 173,0 <0,001	3097 ± 169,0 <0,2

Т а б л и ц а 2

Влияние гексапептида на активность ФА и ФБ в Е (мкА Р_{II}/мин /г ткани) и ФПФ-азы в МЕ (ммкА Р_{II}/мин/г ткани) (данные 8 опытов)

Исследуемая ткань	ФА		ФБ		ФА/ФБ		ФПФ-аза		Изменение, %
	норма	опыт	норма	опыт	норма	опыт	норма	опыт	
Сердце <i>P</i>	2,7 ± 0,1	1,7 ± 0,2 <0,005	5,2 ± 0,2	7,8 ± 0,3 <0,001	0,52	0,22	120 ± 5,5	209 ± 20 <0,005	+74
Мышца <i>P</i>	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2 >0,5	7,7 ± 0,2	5,6 ± 0,4 <0,005	0,11	0,14	104 ± 11	63 ± 8 <0,02	-40
Печень <i>P</i>	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,3 >0,5	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1 <0,005	1,0	1,8	200 ± 7	97 ± 15 <0,001	-52
Мозг <i>P</i>	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,2 >0,5	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,3 >0,5	0,46	0,45	208 ± 10	185 ± 11 <0,2	-11

кация, аллостерическая регуляция метаболитами и неферментативные переходы димер ↔ тетрамер (11). При введении гексапептида *in vivo* функционирует, по-видимому, первый из них — ковалентная модификация, проявляющаяся в изменении коэффициента ФА/ФБ.

Как известно, конформационные переходы ФА ↔ ФБ происходят при соответствующем фосфорилировании и дефосфорилировании фосфорилаз, находящемся под контролем соответствующей киназы и фосфатазы. Учитывая то обстоятельство, что фосфорилаза является фосфопротеином, а ФПФ-аза — ферментом, обладающим широкой специфичностью к различным фосфопротеинам, в том числе и к фосфорилазе [12—14], представляло интерес проследить за изменениями активности этого фермента в тканях у

крыс. Данные, приведенные в табл. 2, подтверждают это положение. Активность ФПФ-азы сердечной мышцы повышается более чем на 70% через 15 мин после введения гексапептида. В скелетных мышцах и в печени отмечено подавление ФПФ-азной активности (соответственно на 40 и 50%). Отмечена также тенденция к понижению ФПФ-азной активности в мозге.

Полученный материал позволяет в известной мере представить последовательность процессов, происходящих в тканях-мишенях при попадании в кровоток физиологических концентраций гексапептида: гормон → фосфопротеинфосфатаза → фосфорилаза → гликоген. При этом реакция сердечной мышцы отличается от реакции других изученных тканей. Так, в печени (и в меньшей степени в скелетных мышцах) подавляется активность ФПФ-азы, увеличивается коэффициент ФА/ФБ и вследствие этого гликогенолиз, что приводит к понижению запасов гликогена в этих тканях. В сердце повышение активности ФПФ-азы приводит, по-видимому, к соответствующему дефосфорилированию ФА, переходу ее в неактивную ФБ, в результате чего происходит существенное накопление гликогена в сердечной мышце. Требуется, однако, дальнейшие исследования для выяснения характера связи между этими изменениями метаболизма и кардиотропным эффектом изучаемого гексапептида.

Очевидно также, что описанный триггерный механизм эффективен не во всех тканях (мозг, почки). В свете всего изложенного различия в периферическом действии гипоталамического гексапептида могут быть объяснены тканевой гетерогенностью ФПФ-азы [15—17] или наличием специфического промежуточного медиатора, включающегося на этапе между гормоном и фосфатазой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А., Саакян Ф. М. — Док. АН СССР, 1971, т. 201, с. 3—6. — 2. Галоян А. А. — Док. АН Арм. ССР, 1977, т. 64, № 2, с. 116—121. — 3. Лисовская Н. П., Ливанова Н. Б. — В кн.: Биологическая химия. М., 1975, т. 8, с. 110—163. — 4. Галоян А. А., Хумарян Н. Г., Ханазадян А. Х. — Док. АН Арм. ССР, 1977, т. 64, № 5, с. 23—25. — 5. Ilingworth B., Coggi S. T. — In: Biochem. Preparations, 1953, v. 3, p. 1—9. — 6. Feinstein R. N., Folk M. E. — J. Biol. Chem., 1949, v. 177, p. 339—344. — 7. Парсаданян Г. К. и др. — Биол. ж. Армении, 1975, т. 28, с. 25—30. — 8. Taussky H. H., Shorr E. — J. Biol. Chem., 1953, v. 202, p. 675—685. — 9. Morris D. E. Science, 1948, v. 107, p. 254. — 10. Morgan H. E., Parmeggiani A. — J. Biol. Chem., 1964, v. 239, p. 2440—2453. — 11. Zieve F., Ginsmann W. H. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, v. 50, p. 872—878. — 12. Miller T. K., Hasen J. R., Langer J. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, v. 53, p. 466—474. — 13. Nakai S., Thomas J. A. — J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 6459—6467. — 14. Парсаданян Г. К. — Всесоюз. биохим. съезд. 2-й Тезисы. 1969, с. 84. — 15. Rose S. P. R. — Nature, 1962, v. 194, p. 1280—1283. — 16. Taborsky G. — In: Adv. Prot. Chem., 1974, AP, p. 1—204.

Поступила 29/IX 1978 г.

MOLECULAR MECHANISMS IN REGULATION BY A HYPOTHALAMIC HEXAPEPTIDE OF SOME STEPS IN GLYCOGEN METABOLISM

A. A. Galoyan, Zh. G. Abelyan, V. V. Baev, L. P. Ter-Tatevosyan, G. K. Parsadanyan

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan,
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow

Alterations in content of glycogen as well as in activity of phosphorylase and phosphoprotein phosphatase were studied in various rat tissues after intravenous administration of a new hypothalamic hexapeptide Tyr-Gly-Leu-Pro-Gly-NH₂. An increase in phosphoprotein phosphatase activity was observed in heart muscle, which correlated with transformation of phosphorylase A to the B form and with accumulation of glycogen. The opposite effect was found in liver tissue and skeletal muscle.

В. Ю. Куликов, В. В. Ермолаева, Л. И. Колесникова,
Л. В. Молчанова, Л. В. Косованова

РЕАКЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЖЕЛУДКА И ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

Институт клинической и экспериментальной медицины Сибирского филиала АМН СССР
Новосибирск

Показано увеличение уровня гидроперекисей жирных кислот сыворотки крови у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки на фоне резко сниженной антиокислительной активности сыворотки крови. Зарегистрировано уменьшение количества сульфгидрильных групп и фосфолипидов в сыворотке крови.

До настоящего времени некоторые стороны этиологии и патогенеза язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки продолжают оставаться неясными и спорными. Нарушение взаимодействия кортико-висцеральных, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковых и местных гастродуоденальных процессов, как правило, приводит к изменению трофических процессов в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки [1]. Механизм взаимодействия и развития этих изменений во многом остается непонятным и требует дальнейшего изучения.

В последние годы была показана [2] важная роль в регуляции пролиферативных процессов в тканях продуктами, образующимися в реакциях перекисного окисления липидов (ПОЛ). Выступая в роли ингибиторов клеточного деления, продукты ПОЛ (свободные радикалы, гидроперекиси, альдегиды и т. д.) могут оказывать наряду с рядом известных факторов существенное влияние на течение трофических процессов при различных патологиях, в том числе, очевидно, и при язвенной болезни. Исходя из этого, задачей настоящей работы было изучение интенсивности реакций ПОЛ сыворотки и ряда систем, их регулирующих, у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки.

М е т о д и к а

Интенсивность реакций ПОЛ в сыворотке крови оценивали по способности липидов к аскорбатзависимому переокислению. 0,4 мл сыворотки крови инкубировали при рН 7,4 (фосфатный буфер) с 0,8 ммоль аскорбата и 12×10^{-6} М двухвалентного железа (соль Мора) при температуре 37°C. Общий объем инкубационной смеси был равен 10,0 мл. Концентрация белка составляла 2,0—2,5 мг/мл. Белок определяли по методу Лоури [3]. Образцы (1,0 мл) для определения количества гидроперекисей забирали через 0 и 30 мин инкубации. Гидроперекиси определяли методом [4]. В точке 0 (контроль) определяли количество гидроперекисей в сыворотке крови, инкубированной в физиологическом растворе без добавления инициаторов.

Антиокислительную активность сыворотки крови (АОА) определяли с помощью линетольной модели, разработанной Л. В. Молчановой. Линетол в объеме 2,0 мл смешивали с 0,2 мл сыворотки крови и инкубировали в водяном термостате при температуре 50°C в течение 5 ч при непрерывной подаче воздуха. Образцы для определения гидроперекисей брали через каждый час. 0,1 мл инкубационной смеси помещали в 1,5 мл хлороформа и из него забирали 0,1 мл в 5,0 мл хлороформэтанольной смеси (1:4). Последовательно добавляли 0,1 мл 2,5 н. HCl, 0,1 мл 1% водного раствора соли Мора, 0,1 мл 6% водного раствора роданида аммония, перемешивая смесь после добавления каждого ингредиента. В качестве контроля изучали окисление чистого линетола. Для определения гидроперекисей жирных кислот использовали данные [6] о пропорциональности гидроперекисей концентрации Fe^{3+} . Кроме гидроперекисей жирных кислот, в переводе двухвалентного Fe^{2+} в трехвалентное может участвовать кислород воздуха, поэтому важно учитывать время, прошедшее от начала добавления реактивов, до фотокалориметрирования. Оно должно быть в пределах 10—15 мин. Расчет АОА сыворотки крови проводили общепринятым методом [5]. АОА =

$$= \frac{T_1 - T_2}{P}, \text{ где } T_1 - T_2 - \text{ период индукции, } P - \text{ количество липидов (в г).}$$

Количество гидроперекисей липидов, общих липидов, фосфолипидов, сульфгидрильных групп (SH-групп) и АОА сыворотки крови больных язвенной болезнью и доноров

Группа обследованных	Количество гидроперекисей липидов, × 10 ⁻⁵ моль на 1 мг липидов		Общие липиды, мг%	Фосфолипиды, мг%	АОА, ч·мл/г	SH-группы, мкмоль в 100 мл
	0	30				
	P					
Больные язвенной болезнью в стадии обострения (n=14) Доноры (n=15) P	14,0±2,1 5,8±0,6 <0,001	13,0±0,8 11,9±0,3 <0,01	616,0±88,0 590,0±41,0 Недостоверно	203,0±2,7 246,0±10,6 <0,01	300,0±10,0 500,0±40,0 <0,001	40,0±1,8 55,0±0,6 <0,001

Общие липиды определяли по методу Бюра [3] Фосфолипиды определяли по органическому фосфору [3]. Сульфгидрильные группы определяли по методу В. В. Соколовского [7].

Результаты и обсуждение

Всего обследовано 29 человек, из них больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки 14. Доноров было 15 человек. Больные обследованы весной, в фазе обострения. Диагноз ставили на основании анамнестических, клинических и лабораторных данных. В среднем больные и доноры были в возрасте 30—35 лет. Больные находились на стационарном лечении, кровь брали утром натощак, до начала курса лечения.

Полученные данные представлены в таблице, из которой видно, что наработка гидроперекисей в сыворотке крови у доноров намного выше, чем у больных. Интересно, что у больных язвенной болезнью наблюдается существенное увеличение начального содержания гидроперекисей в липидах сыворотки, характеризующее окисленность липидов. Обнаруженный факт свидетельствует об эндогенной наработке гидроперекисей у больных.

Из таблицы видно, что уровень общих липидов в сыворотке крови больных несколько выше, чем у доноров, но разница недостоверна. У больных отмечается снижение уровня фосфолипидов ($P<0,01$), значительное уменьшение количества сульфгидрильных групп ($P<0,001$). АОА сыворотки крови у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки резко снижена по сравнению с таковой у доноров ($P<0,001$).

Таким образом, исследования показали, что у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки происходит существенное изменение интенсивности реакции ПОЛ сыворотки крови, проявляющееся в увеличении по сравнению с группой доноров начального содержания гидроперекисей жирных кислот или окисленности липидов. Это может быть связано с изменением активности систем, участвующих в регуляции реакций ПОЛ. Указанные системы в настоящее время довольно хорошо изучены [8]. В первую очередь важную роль в регуляции реакциями ПОЛ играет количество субстрата, вступающего в реакции, прежде всего фосфолипидов. Поскольку количество фосфолипидов, как было показано нами и рядом других исследователей [1], у больных язвенной болезнью ниже, чем у доноров, фосфолипиды, очевидно, не играют ведущей роли в изменении процессов переокисления липидов сыворотки крови. Наблюдается тесная обратно пропорциональная зависимость между количеством гидроперекисей

жирных кислот, АОА сыворотки крови и концентрацией сульфгидрильных групп. Эта зависимость является вполне логичной и вытекает из известных данных о роли гидроперекисей в окислении тиолов [9] и липидных антиоксидантов [2]. Снижение АОА сыворотки крови у больных язвенной болезнью обусловлено, очевидно, снижением количества сульфгидрильных соединений, а также липидных антиоксидантов и тесно коррелируют с высоким уровнем холестерина, определяемого в сыворотке крови больных язвенной болезнью [1]. Наличие такой корреляции было хорошо проанализировано в работах Г. В. Архиповой и соавт. [10].

Из полученных данных становится понятным, что увеличение начального количества гидроперекисей жирных кислот у больных язвенной болезнью связано со снижением АОА сыворотки крови. Уменьшение концентрации антиоксидантов как липидной, так и белковой природы может быть связано, во-первых, с их перераспределением в организме, во-вторых, с нарушением их всасывания и с повышенным расходом в очаге поражения.

В работе [11] на примере канцерогенеза была показана возможность миграции антиоксидантов липидной природы к растущей опухоли. При изучении концентраций сульфгидрильных групп сыворотки крови и опухоли у больных раком желудка [12] установлено снижение их в сыворотке и увеличение в опухоли, в то время как у больных язвенной болезнью их концентрация снижалась как в сыворотке, так и в районе язвы. Из этого следует, что только процессы, сопровождающиеся активными пролиферативными реакциями (например, опухоль), могут выступать в роли своеобразных системообразующих факторов, способствуя перераспределению в организме антиоксидантов липидной и белковой природы. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки развивается на фоне повышенного содержания гидроперекисей, вызванного не перераспределением антиоксидантов, а либо их повышенным расходом в очаге, либо нарушением процессов всасывания.

Независимо от той или иной причины есть основания полагать, что в комплексной терапии больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки показано применение средств, обладающих антиоксидантными свойствами (токоферола), и средств, усиливающих антиоксидантные свойства токоферола (аскорбиновой кислоты, метионина). Эффективность этого комплекса была показана при лечении больных хронической пневмонией [13].

Необходимы также проведение более глубоких исследований, направленных на выяснение роли реакций ПОЛ в патогенезе язвенной болезни, и разработка на основании результатов этих исследований рациональных принципов терапии этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бегимбетова Р. С. К вопросу липидного обмена и обеспеченности витаминами больных язвенной болезнью. Автореф. Актюбинск, 1974. — 2. Бурлакова Е. Б. — В кн.: Физико-химические основы регуляции в клетках. М., 1966, с. 15—25. — 3. Покровский А. А. Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969. — 4. Piaser L. — *Nahrung*, 1968, v. 12, p. 679. — 5. Бурлакова Е. Б., Дзюба Н. М., Пальмина Н. П. и др. — Док. АН СССР, 1965, с. 1278—1281. — 6. Lips A., Charman R., McFarlane W. — *Oil and Soap*, 1943, v. 20, p. 240. — 7. Соколовский В. В. — Лабор. дело, 1962, № 8, с. 3. — 8. Владимиров В. Ю., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972. — 9. Вус, Littee, O'brich P. J. The Effectiveness of a Lipid Peroxide in Oxidizing Protein and Non-Protein Thiols *Biochem. J.*, 1968, v. 106, S. 419. — 10. Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б. — В кн.: Липиды в организме животных и человека. М., 1974, с. 23. — 11. Тарусов В. И., Иванов И. И., Петрусевич Ю. М. и др. — В кн.: Свободнорадикальные процессы в биологических системах. М., 1966, с. 211—215. — 12. Коробейник Ф. Г. — Сульфгидрильные группы крови, слизистой оболочки и некоторые другие показатели окислительных процессов у больных

хроническим гастритом, язвенной болезнью и раком желудка. Автореф. Киев, 1968. — 13. Кулиев В. Ю., Егунова М. М., Колесникова Л. И. и др. — В кн.: Механизмы повреждения, резистентности, адаптации и компенсации, т. 2, с. 519.

Поступила 20/III 1978 г.

PEROXIDATION OF LIPIDS IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH GASTRIC AND DUODENAL ULCER

V. Yu. Kulikov, V. V. Ermolaeva, L. I. Kolesnikova, L. V. Molchanova,
L. V. Kosovanova

Content of fatty acid hydroperoxides was increased, antioxidative activity of blood serum as well as content of sulfhydryl groups and phospholipids were distinctly decreased in blood serum of patients with gastric and duodenal ulcer as compared with the blood obtained from healthy donors.

УДК 616-006-008.939.6-097.5-078.7

Г. А. Банников, Т. А. Чипышева

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К А-БЕЛКУ И ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЕГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ

Лаборатория механизмов канцерогенеза Онкологического научного центра АМН СССР, Москва

Получены моноспецифические антитела к А-белку цитозоля печени крыс. Сравнение иммунохимических свойств А-белка и лигандин, связывающих примерно один и тот же круг низкомолекулярных веществ, показало полную неидентичность этих двух белков. Из 19 тканей, экстракты которых были исследованы при помощи стандартной тест-системы, А-белок обнаружен лишь в печени и кишечнике крыс. А-белок появляется в онтогенезе значительно раньше лигандин. Его содержание в печени эмбриона резко возрастает в период между 16-м и 18-м днями беременности, достигая при этом уровня, свойственного для печени взрослого животного. А-белок утрачивается в гепатомах в меньшей степени, чем лигандин. В первичных опухолях его содержание снижается всего в 2—4 раза.

А-белок и лигандин являются изоформами «связывающих» белков, характеризующимися различными стадиями дифференцировки гепатоцита.

В цитозоле печени крыс содержатся два белка: А-белок и лигандин, или В-белок, которые специфически связывают ряд веществ как эндогенного, так и экзогенного происхождения [1, 2]. Спектр лигандов А- и В-белков почти идентичен и включает в себя некоторые канцерогены и лекарства, стероиды, производные гема и некоторые другие вещества [3]. Функцией А- и В-белка, вероятно, является внутриклеточный транспорт или выведение из клетки связываемых соединений [1, 2, 4—6]. Несмотря на то что эти белки так близки по связывающим свойствам и спектру лигандов, их физико-химические свойства резко различны [1]. Можно представить себе несколько различных ситуаций: 1) один из этих белков является продуктом превращения или модификации второго; 2) эти белки не родственны структурно, но связаны функционально и пространственно в одной мультибелковой системе; 3) белки представляют собой изоформы, различающиеся по строению и локализации, но обладающие одной и той же функциональной активностью. Решить, какая из этих трех ситуаций существует реально, можно, сравнив иммунохимические свойства А- и В-белков и их распределение по различным тканям. Ранее нами были получены моноспецифические антитела к В-белку и исследовано его распределение в различных нормальных и опухолевых тканях. Было показано, что этот связывающий белок синтезируется лишь на наиболее продвинутых стадиях в нескольких независимых рядах клеточной дифференцировки [7].

В настоящей работе описано получение моноспецифических антител к А-белку, проведено сравнение иммунохимических свойств А- и В- белков и иммунохимическое изучение распределения А-белка в различных тканях.

Методы исследования

В опытах использовали самцов белых беспородных крыс или крыс линии Вистар, а также мышей линии СЗНА. Возраст, масса и пол животных указаны в описании соответствующих опытов.

Гепатома 27 и гепатома Зайдела были взяты из коллекции лаборатории опухолевых штаммов Онкологического научного центра АМН СССР. Мышинные перевиваемые гепатомы, полученные В. И. Гельштейн [8], были взяты из коллекции нашей лаборатории. Используемые в работе первичные опухоли печени были индуцированы у крыс диетой [7], содержащей 0,06% 3'-метил-4-диметиламиноазобензола (3-меДАБ).

Опухолевые и нормальные ткани гомогенизировали в физиологическом растворе, забуференном до pH 7,4 фосфатным буфером. Гомогенат осветляли центрифугированием при 10 000 г в течение 15 мин.

Препараты А-белка получали по методу Кеттерера и соавт. [9]. Вкратце процедура состояла из следующих этапов: 1) получение цитозоля из печени крыс (30—70 животных, получивших за 16—24 ч перед забоем по 150 мг/кг 3'-меДАБ внутрижелудочно); 2) осаждение балластных белков при pH 4,5; 3) ступенчатая элюция с ДЭАЭ-целлюлозы. Колонку с ДЕ-52 (Whatman) размером 3×20 см уравнивали триэтанол-аминовым буфером pH 8,0, содержащим 1,25 мМ CaCl₂, и наносили на нее материал, полученный на предыдущей стадии. После промывки тем же буфером собирали материал, элюируемый 0,05 М NaCl; 4) гель-хроматография на сефадексе G-100. На колонку размером 3×80 см, уравновешенную 0,8 М фосфатным буфером, содержащим 0,2 М NaCl, наносили 3—4 мл концентрата материала, полученного на предыдущей стадии. Собирали пик, содержащий азокраситель, который определяли по розовому окрашиванию при подкислении среды до pH 1,0—2,0. Всего по описанной схеме очистки в разное время было получено 4 препарата.

Аналитический электрофорез. Использовали систему электрофореза в 5,6 или 11,2% полиакриламидном геле в трис-ацетатном буфере pH 7,2 в присутствии 1% сульфододecilсульфата (СДС). Перед нанесением на гель образцы белков растворяли в диссоциирующем буфере следующего состава: трис-HCl 10 мМ pH 8,0; ЭДТА 0,02%; 2-меркаптоэтанол 1%; сахараза 5%; пиронин 0,005%. На один гель наносили 10—100 мкг белка и опыт проводили в течение 1½—2 ч, в результате чего зона пиронина проходила расстояние 75 мм.

Электрофокусирование. Опыты проводили в колонке фирмы LKB на 110 мл в интервале pH 3,0—10,0 или 5,0—8,0, используя рекомендации этой фирмы.

Спектры оптического поглощения препаратов А-белка записывали на регистрирующем спектрофотометре «Uniscan» SP-800 при концентрации белка 10 мг/мл при нейтральном pH.

Получение антисывороток. Раствор А-белка (2—4 мг/мл) смешивали с равным объемом адъюванта Фрейнда (фирмы «Difco»). Кроликов массой 1,5—2 кг иммунизировали в подколенные лимфатические узлы обеих задних лап, по 200—400 мкг белка в каждый лимфатический узел. Через 30 дней кролики получали еще по 400—800 мкг белка; половину дозы внутривенно, половину — подкожно. Первое взятие крови производили через 5—7 дней после реиммунизации. В разное время четыремя различными препаратами А-белка было иммунизировано 6 кроликов.

Реакция иммунодиффузии. Использовали микромодификацию А. И. Гусева и В. С. Цветкова [10]. Полуколичественный анализ проводили по Н. И. Храмовой и Г. И. Абелеву [11], используя стандартную тест-систему.

Моноспецифические антитела. Если нативная антисыворотка не была моноспецифической, то моноспецифичности добивались истощением ее экстрактами, содержащими примесный антиген (экстракт селезенки), под контролем реакции иммунодиффузии. Затем моноспецифическую антисыворотку инкубировали с заранее подобранной эквивалентной дозой экстракта, содержащего А-белок (экстракт печени) 1 ч при 37°C и 16 ч при 4°C. Образующийся осадок промывали 5 раз забуференным физиологическим раствором и диссоциировали в глицин-солянокислом буфере pH 2,2. Нерастворимый материал материал отбрасывали, а раствор наносили на колонку с сефадексом G-200, уравновешенную тем же буфером. Пик, содержащий антитела, нейтрализовали, проверяли на моноспецифичность и использовали в дальнейшей работе.

Результаты

Характеристика препаратов А-белка

Примененный метод очистки А-белка [9] дает хорошие и воспроизводимые результаты. Как правило пик, содержащий А-белок, при хроматографии на колонке с сефадексом G-100 хорошо разрешается от примесных

пиков и элюируется несколько раньше, чем цитохромы С, но значительно позднее овальбумина. Электрофорез в полиакриламидном геле с СДС выявлял в таких же препаратах одну узкую интенсивную полосу и следы более высокомолекулярного компонента (рис. 1). Подвижность основной зоны на электрофореграммах была несколько выше подвижности цитохрома С, но значительно ниже подвижности инсулина. Выход конечного препарата составлял примерно 1 мг на 500 мг белка цитозоля. При нейтральном рН в пре-

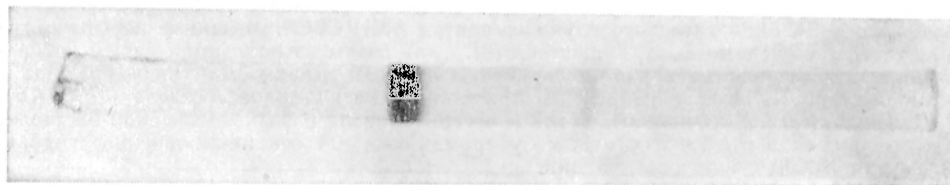


Рис. 1. Электрофореграмма препарата А-белка.
11,2% полиакриламидный гель в трис-ацетатном буфере, 1% СДС.

паратах А-белка регистрировались максимум оптического поглощения в районе 380 нм и характерная система максимумов между 250 и 285 нм. При подкислении среды появлялся новый интенсивный максимум при 520 нм. Электрофокусирование препаратов А-белка выявляло три пика в областях рН 7,1—7,2; 6,0—6,2 и 5,1—5,2.

Характеристика антисывороток к препаратам А-белка и получение моноспецифических антител к А-белку

При тестировании антисывороток в реакции иммунодиффузии с препаратами А-белка и экстрактами печени в отдельных случаях выявлялся лишь один компонент. Некоторые из сывороток содержали, однако, добавочные

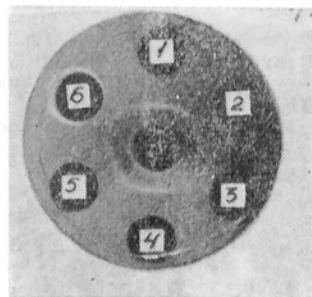


Рис. 2. Выявление А-белка в различных экстрактах.

В центральной лунке — препарат моноспецифических антител к А-белку, в лунках 1 и 4 — экстракт печени в оптимальном разведении (тест-система), в лунках 2 и 5 — экстракт кишечника, в лунке 3 — экстракт печени, в лунке 6 — экстракт селезенки.

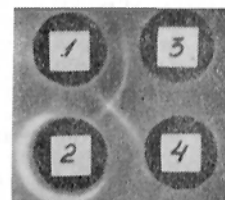


Рис. 3. Выявление полной антигенной неидентичности А-белка и лигандин. В лунках 1 и 4 — тест-система на А-белок; в лунках 2 и 3 — тест-система на лигандин.

минорные компоненты. Антиген, соответствующий главному компоненту, не выявлялся при реакции антисывороток с экстрактами селезенки, в то время как минорные компоненты обнаруживались в та-

кой реакции. Благодаря этому, истоящая антисыворотки экстрактами селезенки, можно добиться их моноспецифичности по главному компоненту. Чистые моноспецифические антитела из таких моноспецифических антисывороток выделяли по методу, описанному в разделе «Методы исследования». Проверка этих антител в реакции иммунодиффузии с препаратами А-белка,

экстрактами печени и многих других тканей (см. ниже) подтвердила их монспецифичность (рис. 2). Препараты таких антител и экстракты печени в максимальных разведениях, все еще обеспечивающих четкость реакции в иммунодиффузии, служили стандартной тест-системой. Чувствительность наших тест-систем на А-белок составляла 2—5 мкг/мл.

Имунохимическое сравнение А-белка с лигандином

Тест-система на А-белок не давала реакции с препаратами лигандина, и, наоборот, тест-система на лигандин [7] не давала реакции с препаратами А-белка. При непосредственном сравнении этих двух тест-систем выявляется полная неидентичность антигенных свойств А-белка и лигандина (рис. 3).

Распределение А-белка по нормальным и опухолевым тканям

Полуколичественный анализ содержания А-белка в различных тканях дал следующие результаты (см. таблицу). Титр исследуемого антигена в экстрактах печени крыс и мышей обоего пола составлял 1 : 1024—1 : 2048, что соответствует концентрации 2—4 мг на 1 мл цитозоля. В онтогенезе резкий

Содержание белка в экстрактах нормальных и опухолевых тканей крыс и мышей

Ткань	Возраст животного	Содержание А-белка	
		титр	%
Печень крыс	Эмбрионы 15—16 дней	1:16	1,6
	» 18—20 »	1:1024	100
	Новорожденные 1, 2, 5, 7, 14 дней жизни	1:1024	100
	Взрослые (самцы и самки)	1:1024	100
Тонкая кишка	Взрослые	1:32—1:64	3,1—6,2
Печень мышей линии СЗНА	Взрослые (самцы и самки)	1:1024	100
Первичные опухоли печени крыс		1:128	50
		1:512	50
		1:256	25
		1:128	12,5
Гепатома 27		—	0
Гепатома Зайдела		—	0
Перевиваемые опухоли мышей: гепатома	48	1:32	3,1
	» 46	1:32	3,1
	» 61	1:64	6,2
	» 60	1:16	1,6
Печень мышей опухоленосителей		1:512	50

Примечание. Титр препарата А-белка с концентрацией 1 мг/мл был равен 1 : 512. А-белок не обнаружен в экстракте головного мозга, мочевого пузыря, кожи, матки, яичника, слюнной железы, подкожной жировой ткани, скелетной мышцы, тимуса, легких, мышцы сердца, селезенки, надпочечника, почки, семенника, щитовидной железы, поджелудочной железы.

подъем содержания А-белка в печени наблюдается между 16-м и 18-м днями беременности, причем у 18-дневных эмбрионов его уровень практически не отличается, по данным иммунодиффузии, от уровня в печени взрослых крыс. Из 18 других исследованных тканей А-белок был обнаружен только в экстрактах кишечника, где его титр составлял от 1 : 32 до 1 : 64, что соответствует концентрации 64—132 мкг на 1 мл цитозоля. В первичных опухолях печени, индуцированных 3'-мелДАБ, наблюдается некоторое снижение содержания А-белка (титр 1 : 128 — 1 : 512) по сравнению с печенью. Вероятно, несколько понижена также его концентрация в печени животных, несущих перевиваемую гепатому. В самих перевиваемых гепатомах содержание

А-белка снижается по сравнению с нормальной печенью в десятки раз, а в некоторых (гепатома 27 и гепатома Зайдела) он вообще не определяется, что соответствует понижению его концентрации по сравнению с нормой по крайней мере в 1000 раз.

Обсуждение

Полученные высокоочищенные препараты А-белка по ряду свойств (ориентировочная молекулярная масса по данным гель-фильтрации, спектр в УФ-области, поведение при электрофокусировке) хорошо соответствуют аналогичным препаратам, описанным другими авторами [1, 3]. Присутствие в препаратах связанного азоканцерогена (появление максимума поглощения при 520 нм при закислении) также является характерным свойством А-белка. Полученные препараты оказались достаточно чистыми, чтобы в некоторых случаях индуцировать моноспецифические сыворотки при иммунизации кроликов. В других случаях этого удалось достичь дополнительным поглощением антисывороток.

Прямое сравнение антител к лигандину и А-белку показало, что антигенные свойства этих белков совершенно различны. Антигенные детерминанты А-белка, по-видимому, не видоспецифичны, так как антитела к крысиному белку практически одинаково хорошо реагируют как с антигеном из печени крыс, так и с мышинным антигеном. Крысиный же лигандин имеет очень слабый перекрест с соответствующим мышинным антигеном [7].

Различным оказалось и распределение этих двух белков по тканям. А-белок не определяется в некоторых тканях, в которых присутствует лигандин (почки, гонады). С другой стороны, А-белок присутствует в печени эмбрионов и молодых крыс такого возраста, у которых лигандин не выявляется.

Таким образом, два белка, столь близкие по свойству специфически связывать один и тот же набор низкомолекулярных лигандов, резко различаются по физико-химическим и антигенным свойствам. Из этого можно заключить, что данные белки не являются взаимопревращающимися формами. Различие же в их распределении по тканям говорит о том, что не существует и жесткой пространственной связи между ними и они могут функционировать независимо.

Из всего этого следует, что лигандин и А-белок аналогично хорошо известным изоферментам можно было бы назвать «изосвязывающими» или «изо-транспортными».

Изоферменты часто определяют не только специфичность ткани, но и определенный уровень дифференцировки в одном клеточном ряду. То же мы видим и в случае «изосвязывающих» белков: А-белок появляется в печени на значительно более ранних стадиях онтогенеза, чем лигандин. Следовательно, в процессе дифференцировки гепатоцита должна быть промежуточная стадия созревания, на которой клетка уже «достаточно» дифференцирована, чтобы содержать А-белок, но еще «недостаточно» дифференцирована, чтобы содержать лигандин. Отсюда понятно, почему А-белок в большей степени сохраняется в первичных гепатомах, чем лигандин.

Авторы выражают глубокую благодарность доктору мед. наук В. И. Гельштейн за любезно предоставленные штаммы перевиваемых гепатом мышей, проф. Ю. М. Васильеву за ценные замечания, сделанные при выполнении этой работы и подготовке ее к печати.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ketterer B., Tipping E., Beale D. et al. — In: Glutathione: Metabolism and Function. Ed. I. M. Arias, W. B. Jakoby. New York, 1976, v. 6, p. 243.
2. Tipping E. et al. — Biochem. Soc. Trans., 1975, v. 3, p. 680.
3. Arias I. M., Fleischner R., Kirsch R. — In: Glutathione: Metabolism and Function. Ed. I. M. Arias, W. B. Jakoby. New York, 1976, v. 6, p. 175.
4. Habig W. H.,

Pabst M. T., Fleischner G. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 3879. — 5. Litwack G. — In: Glutathione: Metabolism and Function. Ed. I. M. Arias, W. B. Jakoby, New York, 1976, v. 1, p. 285. — 6. Bannikov G. A., Guelstein V. I., Tchirysheva T. A. — Int. J. Cancer, 1973, v. 11, p. 398. — 7. Гельштейн В. И. — Цитология, 1971, № 1, с. 3. — 8. Kettiger B., Ross-Mansell P., Whitehead T. K. — Biochem. J., 1967, v. 103, p. 316. — 9. Гусев А. И., Цветков В. С. — Лабор. дело, 1961, № 2, с. 43. — 10. Храмкова Н. И., Абелев Г. И. — Бюлл. exper. биол., 1961, № 12, с. 107.

Поступила 27/III 1978 г.

THE PREPARATION OF MONOSPECIFIC ANTIBODIES AGAINST A-PROTEIN AND IMMUNOLOGICAL STUDY ON DISTRIBUTION OF THIS PROTEIN IN NORMAL AND TUMOR TISSUES

G. A. Bannikov, T. A. Tchirysheva

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

Monospecific antibodies against A-protein from rat liver cytosol were prepared. Complete nonidentity was established in comparison of the A-protein and ligandin, which was similar to A-protein in binding properties. Besides, A-protein found in cytosol of liver tissue was present in cytosol of small intestine. It was not found in the cytosol of other 17 tissues. A-protein appeared in ontogenesis earlier than ligandin: its concentration sharply increased in rat embryonal liver within 16—18 day of gestation. Level of A-protein was decreased 2—4-fold in primary rat hepatomas. A-protein and ligandin are the isoforms of binding proteins, which characterize different steps of the differentiation of the hepatocytes.

УДК 612.753

В. С. Песчанский, Г. С. Либинсон

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМА МИНЕРАЛИЗАЦИИ ЭПИФИЗАРНОГО ХРЯЩА ПРИ ЭНХОНДРАЛЬНОМ [ОСТЕОГЕНЕЗЕ]

Центральная научно-исследовательская лаборатория Гродненского медицинского института, Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков, Москва

Механизм минерализации эпифизарного хряща рассмотрен в свете закономерностей ионного обмена. Хондроитинсульфат матрикса, будучи полиэлектролитом, служит поставщиком ионов кальция. Перичеллюлярная зона матрикса рассматривается как полупроницаемая ионитовая мембрана. Движущей силой процесса является внутриклеточный гликогенолиз в хондроцитах, вступающих в зону минерализации. Высокая концентрация глюкозы в лакунах хондроцитов вызывает осмотический перенос воды из матрикса в лакуны, вследствие чего концентрация ионов в свободном объеме матрикса возрастает, что приводит к поступлению ионов кальция из фазы полиэлектролита в свободный объем. В последнем по достижении состояния насыщения выпадает осадок двузамещенного фосфата кальция. Стереологические исследования эпифизарного хряща, модельные опыты и расчеты подтверждают предлагаемую модель механизма минерализации.

Интерес к механизмам минерализации твердых тканей возрос с конца 40-х годов, когда с развитием ядерных исследований выяснилось, что некоторые продукты деления прочно фиксируются скелетом. Однако и сегодня механизмы минерализации тканей скелета, в том числе эпифизарного хряща (ростовой пластинки), остаются неясными. Каким образом осуществляется насыщение тканевой жидкости хряща фосфатом кальция до уровня его седиментации? Что представляет собой «местный фактор» минерализации [1], определяющий строгую локализацию процесса в узкой зоне хряща на границе с формирующейся костью? Какова роль в этом процессе гликогенолиза в гибнущих хондроцитах и гликозаминогликанов матрикса эпифизарного хряща? Ни одна из предложенных гипотез не в состоянии ответить на эти вопросы, не вступая в противоречие с установленными фактами или не прибегая к более или менее произвольным допущениям [2—12]. Это в полной мере относится и к интенсивно разрабатываемой в последние

годы гипотезе «матричных везикул» [13, 14], поскольку попытка связать механизм минерализации с их ферментативной активностью потерпела неудачу [15].

Рассмотрение этой проблемы в свете закономерностей диффузии и ионного обмена позволяет не только по-новому осмыслить уже имеющиеся сведения, но и построить целостную физико-химическую модель процесса.

В работе нами использованы данные литературы и результаты собственных исследований, в том числе полученные путем моделирования отдельных звеньев изучаемого процесса.

Методика

Фазу полиэлектролита матрикса моделировали сульфосефадексом SE-25 с близкой набухаемостью (содержание сухого вещества в сефадексе, набухшем в воде, 8%, обменная емкость 4,1 мгэкв/г). Свободный объем моделировали растворами хлоридов натрия и кальция различных концентраций. Равновесие в системе сефадекс — раствор изучали в динамическом режиме. Через сефадекс в натриевой форме профильтровывали

Таблица 1

Поглощение ионов кальция сефадексом SE-25 из растворов хлоридов натрия и кальция при постоянном отношении их концентраций ($M \pm m$)

Раствор	Концентрация, мМ	Число опытов	Количество поглощенных ионов кальция, мэкв на 1 г сухого вещества
Хлорид натрия	150	6	$0,3546 \pm 0,0098$
» кальция	2,5		
» натрия	225	13	$0,2671 \pm 0,0085$
» кальция	3,75		
» натрия	300	10	$0,2444 \pm 0,0062$
» кальция	5,0		
» натрия	375	8	$0,2228 \pm 0,0047$
» кальция	6,25		

Таблица 2

Поглощение ионов кальция сефадексом SE-25 из растворов хлоридов натрия и кальция при различном отношении их концентраций ($M \pm m$)

Раствор	Концентрация, мМ	Число опытов	Количество поглощенных ионов кальция, мэкв на 1 г сухого вещества
Хлорид натрия	150	6	$0,3546 \pm 0,0098$
» кальция	2,5		
» натрия	225	6	$0,1791 \pm 0,0067$
» кальция	2,5		
» натрия	300	8	$0,1428 \pm 0,0045$
» кальция	2,5		
» натрия	375	6	$0,0844 \pm 0,0065$
» кальция	2,5		

вали раствор нужного состава. После достижения равновесия (выравнивание концентраций кальция на входе и выходе колонки) в фильтрате измеряли концентрацию ионов кальция с помощью ионитового кальций-селективного электрода и по полученным данным рассчитывали ионный состав сефадекса. Результаты опытов представлены в табл. 1 и 2. Из данных табл. 1 и 2 видно, что объемная концентрация ионов кальция в сефадексе, уравновешенным раствором, моделирующим свободный объем матрикса до начала минерализации, примерно в 20 раз выше, чем в модельном растворе. При концентрировании последнего в 2,5 раза содержание ионов кальция в сефадексе снижается на 40%, а при увеличении отношения концентраций ионов натрия и кальция — в 1,5 раза (на 50%).

Перенос компонентов в системе физиологический раствор хлоридов натрия и кальция — модель мембраны — раствор глюкозы в физиологическом растворе хлоридов изучали в двухъячейной диффузионной камере. Моделью мембраны служила хрящевая пластинка уха кролика. Установлено, что осмотический перенос воды в указанной системе сопровождается повышением концентрации ионов кальция в первом растворе. Принимая во внимание большую удельную поверхность лагун в зоне мине-

реализации и специфическую структуру перицеллюлярной зоны матрикса, следует полагать, что в реальной зоне минерализации осмотический транспорт воды осуществляется весьма эффективно.

Результаты и обсуждение

Рассмотрим условия, существующие в эпифизарном хряще до начала его минерализации. При этом матрикс хряща будем рассматривать как двухфазную систему, состоящую из полиэлектrolита и свободного объема. Под фазой полиэлектrolита мы понимаем объем матрикса вблизи полиэлектrolитных цепей, в котором действуют доннановские силы исключения коионов. Остальную часть объема матрикса мы называем свободным. Свободный объем находится в равновесии с сывороткой крови и до начала минерализации идентичен ей по количественному и качественному составу входящих в него минеральных компонентов. Полиэлектrolит представлен в основном хондроитинсульфатом, содержание которого в матриксе достигает 5,5—8% [16—19]. Отношение ионов натрия и кальция в фазе полиэлектrolита и свободном объеме определяется уравнением равновесия ионного обмена. При этом относительное содержание ионов кальция в полиэлектrolите в 20 раз и более выше, чем в свободном объеме [20, 21], что обусловлено широко известной селективностью полиэлектrolитов к ионам с более высокой зарядностью. Важно отметить, что перицеллюлярная зона матрикса отличается от остальной его части наличием коллагенового каркаса [22, 23] и повышенным содержанием высокополимеризованного сульфополисахарида [24—26] и представляет собой своего рода мембрану, напоминающую клеточную стенку растений. До начала минерализации активность воды по обе стороны этой мембраны, т. е. в хондроцитах и матриксе, одинакова. Эпифизарный хрящ богат гликогеном, содержание его достигает 7—9 мг на 1 г сырой массы [27]. Поскольку гликоген содержится только в хондроцитах, а их объемная доля не превышает 25% [28], очевидно, что на долю гликогена приходится около 3—4% клеточной массы.

Со вступлением гипертрофированных хондроцитов в зону минерализации накопленный ими гликоген очень быстро исчезает [29—31]. Ввиду того что активность фосфорилазы здесь недостаточно высока [27], распад гликогена идет преимущественно гидролитическим путем. Наши опыты со свежими срезами эпифизарного хряща, помещенными на субстратную пленку (крахмал), свидетельствуют о высокой α -амилазной активности в зоне минерализации. Впрочем, и фосфоролитический путь распада гликогена, очевидно, заканчивается образованием свободной глюкозы из-за высокой активности здесь щелочной фосфатазы [5, 32]. В результате распада гликогена концентрация глюкозы в лакунах гибнущих хондроцитов повышается, вероятно, до 3% и более. Вследствие этого активность воды в лакунах падает и начинается осмотический перенос воды через указанную выше перицеллюлярную мембрану из свободного объема матрикса в лакуны. Перенос в том же направлении катионов затруднен, поскольку мембрану они преодолевают как противоионы, т. е. гораздо медленнее молекул воды [33]. Наоборот, выделяемые органическими фосфатами под действием щелочной фосфатазы ко-ионы неорганического фосфата проходят мембрану сравнительно легко [34] и диффундируют из лакун в свободный объем матрикса. Поступление воды в свободный объем из кровеносных сосудов не компенсирует ее уход в лакуны, поскольку поверхность последних существенно больше. Компенсации препятствует также довольно быстрое продвижение зоны минерализации в толщу эпифизарного хряща [27, 35]. В результате концентрация ионов в свободном объеме возрастает, что ведет к нарушению его равновесия с фазой полиэлектrolита. При этом в соответствии с законами ионного обмена ионы кальция из полиэлектrolита переходят в свободный объем, где по достижении состояния насыщения и начинается выпадение осадка фосфата кальция. В условиях роста концентрации ионов каль-

ции и натрия и изменяющегося их соотношения в пользу ионов натрия хондроитинсульфат должен вести себя как типичный катионит, например сульфосефадекс (см. табл. 1 и 2). В связи с этим есть все основания считать, что в механизме минерализации хондроитинсульфату принадлежит роль ионообменного материала, предварительно накапливающего большое количество ионов кальция, а затем поставляющего их в раствор в нужный момент и в надлежащем месте.

До начала минерализации концентрация ионов кальция и фосфата в свободном объеме, как и в сыворотке крови, составляет 0,005 н. и 0,001 н. соответственно. Исходя из значения констант ионизации фосфорной кислоты и принимая рН 7,5, можно подсчитать, что концентрация ионов HPO_4^{2-} и PO_4^{3-} в свободном объеме составляет соответственно 0,00132 н. и $1,43 \times 10^{-8}$ н. Таким образом, произведения концентраций ионов в соответствующих степенях для CaHPO_4 и $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в свободном объеме составляют $6,7 \times 10^{-6}$ и $2,5 \times 10^{-23}$ (в шкале нормальностей). Для насыщенных растворов соответствующие значения произведения растворимости равны $2,1 \times 10^{-5}$ и $2,5 \times 10^{-17}$ [36]. Из этих расчетов видно, что концентрация трехзамещенного фосфата кальция в свободном объеме очень далека от насыщения, тогда как для двухзамещенного состояние насыщения достигается уже при концентрировании раствора всего в 1,8—1,9 раза. Принимая во внимание отмеченное выше поступление ионов кальция из полиэлектролита и фосфат-ионов из лакун гибнущих хондроцитов, следует заключить, что выпадение осадка CaHPO_4 начинается уже при существенно меньшем концентрировании раствора в свободном объеме. Между тем стереологическое исследование показало, что в зоне минерализации объемная доля матрикса по сравнению с предшествующими зонами уменьшается почти в 2,5 раза [28], чего более чем достаточно для обильного образования осадка. При этом следует иметь в виду, что продолжающееся концентрирование раствора в свободном объеме и выпадение кальция в осадок ведут к увеличению отношения концентраций ионов натрия и кальция, следствием чего является дополнительный выход ионов кальция из фазы полиэлектролита в свободный объем, чем обеспечивается дальнейшее образование осадка. Из приведенных расчетов следует, что выпадающий на первой стадии минерал представляет собой двухзамещенный фосфат кальция, который в дальнейшем трансформируется в кристаллический оксиапатит [21, 37].

В заключение можно указать, что предлагаемая физико-химическая модель механизма минерализации позволяет связать ряд фактов и выдвигающихся для их объяснения гипотез в единую цепь взаимосвязанных процессов. В этой цепи находят свое место и биологический смысл и накопление хондроцитами больших количеств гликогена как источника энергии [30, 31], и роль хондроитинсульфата как источника ионов кальция [30, 38], и значение щелочной фосфатазы как поставщика фосфат-ионов [32], и своеобразие строения перицеллюлярной зоны матрикса как полупроницаемой ионообменной мембраны, обеспечивающей селективный осмотический транспорт воды из матрикса в лакуны. Нетрудно заметить, что фактор, «запускающий» механизм минерализации и являющийся его движущей силой, — внутриклеточный гликогенолиз. Следовательно, именно гликогенолиз, время и место которого, надо полагать, детерминированы генетически, и есть искомый «местный фактор минерализации» [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Sobel A. E. — In: Metabolic interrelation. Transact. of the 2-nd Conf. New York, 1950, p. 113—143. — 2. Глимер М. — В кн.: Современные проблемы биофизики. М., 1961, т. II, с. 94—127. — 3. Ньюман У., Ньюман М. Минеральный обмен кости. М., 1961. — 4. Вачра В. Н. — In: International review of connective tissue research. New York—London, 1970, p. 165—208. — 5. Bourne G. H. — In: The biochemistry and physiology of bone. New York—London, 1972, v. 11, p. 79—120. — 6. Estoe J. E. Calc. Tiss. Res., 1968, v. 2, p. 1—19. — 7. Gli-

- mcher M. J., Krane S. M. — In: Treatise on collagen. London—New York, 1968, v. 11, p. 67—251. — 8. Хансоx N. M. Biology of bone. Biological structure and function. Cambridge, 1972, № 1. — 9. Howel D. S. — J. Bone Joint Surg., 1971, v. 53-A, p. 250—258. — 10. Sobel A. E., Laurence P. A., Burger M. — New York Acad. Sci., 1960, ser. II, v. 22, p. 233—243. — 11. Weidman S. M. — In: Internat. rev. of connective tissue research. New York—London, 1963, v. 1, p. 339—377. — 12. Zambotti V., Bolognani L. — In: Callus formation. Budapest, 1967, p. 5—34. — 13. Anderson H. C. — Fed. Proc., 1976, v. 35, p. 105—108. — 14. Slavkin H. C., Croissant R., Guenther H. et al. — 10-th Int. Cong. Anat., Tokyo, 1975, p. 35. — 15. Sajdera S. W., Franklin S., Fortuna R. — Fed. Proc. 1976, v. 35, p. 154—155. — 16. Касавина Б. С., Кольчинская Т. А., Зенкевич Г. Д. — Усп. совр. биол., 1970, т. 69, с. 353—363. — 17. Слудцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л., 1969. — 18. Laurent T. C., Wasteson A. — In: Aging of connective and skeletal tissue. Stockholm, 1969, p. 65—80. — 19. Schubert M., Hamerman D. — In: The amino sugars. New York — London, 1965, v. 11A, p. 257—279. — 20. Hjertquist S.-O. — Acta soc. med. Upsal., 1964, v. 69, p. 23—40. — 21. Wuthier R. E., Bisaz S., Russell R. G. G. et al. — Calc. Tiss. Res., 1972, v. 10, p. 198—206. — 22. Stockwell R. A. — Phil. Transact. Roy. Soc. London, 1975, v. B271, p. 243—245. — 23. Szirmai J. A. — In: Aging of connective and skeletal tissue. Stockholm, 1969, p. 163—184. — 24. Песчанский В. С. — Арх. анат., 1970, т. 59, № 9, с. 22—27. — 25. Песчанский В. С. — Арх. анат., 1973, т. 65, № 12, с. 46—49. — 26. Riede U. N., Villiger W., Schnek R. R. — Virch. Arch., Abt. B, 1971, v. 7, p. 114—125. — 27. Eg-Larsen N. — Acta physiol. scand., 1956, v. 38, suppl., p. 128. — 28. Песчанский В. С. — Здравоохр. Белоруссии, 1977, № 9, с. 88. — 29. Follis R. H., Berthrong M. — Bull. J. Hopkins. hosp., 1949, v. 85, p. 281—298. — 30. Gutman A. B., Yut. — In: Metabolic interrelations. Transact. of the 2-nd conf. New York, 1950, p. 167—190, 255—257. — 31. Harris A. — Nature, 1932, v. 130, № 3296, p. 996—997. — 32. Robinson R. — Biochem. J., 1923, v. 17, p. 286—293. — 33. Гельферих Ф. Иониты. М., 1962. — 34. Лайтфут Э. Явления переноса в живых системах. М., 1977. — 35. Hansson L. I., Menander-Sellman K., Stenstrom A. — Calcif. Tiss. Res., 1972, v. 10, p. 238—251. — 36. Справочник химика. Т. 2, 3. М., 1952. — 37. Thyberg J. — J. Ultrastruct. Res., 1974, v. 46, p. 206—218. — 38. Rubin P. S., Howard J. E. — In: Metabolic interrelations. Transact. of the 2-nd conf. New York, 1950, p. 155—166.

Поступила 31/III 1978 г.

PHYSICO-CHEMICAL ASPECTS OF MINERALIZATION OF EPIPHYSIAL CARTILAGE IN ENCHONDRIAL OSTEOGENESIS

V. S. Peschansky, G. S. Libinson

Central Research Laboratory, Medical School, Grodno, All-Union Institute of Antibiotics, Moscow

Mechanism of epiphyseal cartilage mineralization is considered in terms of ion exchange concepts. Chondroitin-sulfate of matrix, which is a polyelectrolyte, served as a donor of calcium ions. Pericellular zone of matrix is considered as a semipermeable membrane. The energetic basis of the process is provided by intercellular glycogenolysis in chondrocytes, entering the zone of mineralization. High concentration of glucose in lacunas of chondrocytes led to osmotic transport of water from matrix to lacunas, causing an increase in concentration of ions in free volume of the matrix. Due to ion exchange release of calcium ions occurred from the phase of polyelectrolyte into the free volume, where the state of saturation was achieved and dicalcium phosphate CaHPO_4 was precipitated. Stereologic studies of epiphyseal cartilage, simulation experiments and calculations corroborate the mechanism of mineralization advanced.

Т. К. Платонова, О. А. Петренко

ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА ЧЕЛОВЕКА И ФРАКЦИИ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ПЛАЗМЫ ОБОГАЩЕННОЙ ЭТИМ ФЕРМЕНТОМ

Отдел консервирования тканей и трансфузиологии Научно-исследовательского института скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

*Из фибринолитически активной плазмы (ФАП) промывной крови внезапно умерших получен активатор пламиногена с удельной специфической активностью 203 АЕ/мг, что в 88 раз превышает активность исходной плазмы. Фермент является гликопротеидом, относится к β -глобулиновой фракции, его молекулярная масса по данным гель-фльтрации составляет 70 000, изоэлектрическая точка находится при рН 6,2. Активатор пламиногена термостабилен при нагревании от 0 до 50°C. Исследовано влияние рН инкубационной среды и катионов на активность этого фермента. Методом осаждения этанолом на холоду и при заданном рН из ФАП получена фибринолитически активная фракция (ФАФ), обогащенная активатором пламиногена. Удельная фибринолитическая активность ее в среднем в 17,6 раза выше таковой плазмы. В опытах *in vitro* фракция проявляла высокую тромболитическую и антитромбиновую активность. По тромболитическому действию она аналогична препаратам стрептазы и стрептокиназы. Показана относительная видовая специфичность фибринолитического и антитромбинового действия ФАФ.*

Получение естественных для человека тромболитических препаратов имеет важное значение для практического здравоохранения. В этой связи обращает на себя внимание фибринолитически активная плазма (ФАП) крови внезапно умерших, содержащая основные компоненты фибринолитической системы: проактиватор и активатор пламиногена, плазмин, пламиноген [1—3]. Установлено, что основным ферментом, определяющим литические свойства ФАП, является активатор пламиногена [4—6]. Разработан лабораторный способ его получения [5]. Однако в литературе не приводятся характеристики свойств плазменного активатора пламиногена. Предпринимались попытки получения из плазмы крови, взятой у трупа, препаратов фибринолитического действия. Предложен метод получения «фибринолизина», проявляющего в основном плазминовую активность [7]. Кроме того, выделен «трупный фактор», обладающий активаторной активностью [8], однако не приведены методика его получения и физико-химическая характеристика. Поэтому вопрос о получении тромболитического препарата из ФАП, действующим началом которого является активатор пламиногена, остается открытым.

Целью настоящей работы явилась характеристика активатора пламиногена человека и фракции ФАП, обогащенной этим ферментом.

Методы исследования

В работе использованы плазма цельной и промывной крови внезапно умерших (не более 6 ч после смерти), заготовленная на растворе ЦОЛИПК-76 [9]. Реактивы: стрептаза (Streptase), фирма «Behringwerke» (ФРГ); стрептокиназа (Awelysin), фирма «Germed» (ГДР); сефадексы G-25, G-200, ДЭАЭ-сефадекс А-50, декстран Т-2000, фирма «Pharmacia Fine Chemicals» (Швеция), амфолины, фирма ЛКВ (Швеция); отечественные препараты — бычий фибриноген, тромбин, не содержащий пламиногена, казеин по Гаммерстену.

Общую фибринолитическую активность ФАП и фибринолитически активной фракции (ФАФ) определяли по времени лизиса стандартного фибринового сгустка и выражали в фибринолитических единицах (ФЕ) на 1 мл [10]. 1 ФЕ соответствует такому количеству фермента, которое вызывает лизис 1 мг фибринового сгустка из плазмы крови донора за 30 мин при 37°C.

Активатор пламиногена и плазмин исследовали модифицированным методом лизиса стандартных фибриновых пластин [5]. Активность активатора пламиногена выражали в активаторных единицах (АЕ) на 1 мл. 1 АЕ соответствует такому количеству фермента, которое, превращая пламиноген в плазмин, вызывает лизис 1 мг фибрина стандартной пластины за 20 ч при 37°C. Активность плазмينا рассчитывали в плазминовых единицах (ПЕ) на 1 мл. 1 ПЕ соответствует такому количеству

фермента, которое вызывает лизис 1 мг прогретого фибрина стандартной пластины за 20 ч при 37°C. Активность плазминогена определяли казеинолитическим методом [11] и выражали в казеинолитических единицах (КЕ) на 1 мл. 1 КЕ соответствует количеству фермента, которое высвобождает 450 мкг-экв кислоторастворимого тирозина за 1 ч при 37°C. Общую антипротеазную активность (ингибиторы фибринолиза) определяли по торможению расщепления казеина трипсином и выражали в ингибиторных единицах (ИЕ) на 1 мл. 1 ИЕ эквивалентна 1 КЕ.

Количество белка определяли методом Лоури [12] или спектрофотометрически. Удельную активность ферментов рассчитывали в соответствующих единицах на 1 мг белка.

Тромболитическую активность ФАП, ФАФ, стрептазы, стрептокиназы анализировали в системе, моделирующей лизис пристеночного тромба циркулирующей кровью [13]. Активность используемых официальных препаратов соответствовала их среднесуточной дозе в пересчете на 5 мл крови в опыте.

Исследовали коагуляционные свойства крови кроликов массой 2—2,5 кг, которым в яремную вену однократно вводили 500—600 ФЕ ФАФ и спустя 30 и 60 мин определяли в крови фибринолитическую активность, фибриноген, тромбиновое время, время рекальцификации, показатели тромбоэластограммы (ТЭГ).

В препарате активатора плазминогена исследовали общее содержание углеводов [14]. Молекулярную массу определяли методом гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-200 [15]. Калибровочный график строили с использованием стандартных белков: рибонуклеаза (мол. м. 15 000), трипсин (мол. м. 24 000) — препараты фирмы «Reanal» (Венгрия); альбумин сыворотки быка (мол. м. 67 000) — фирмы «Koch-Light» (Англия), альдолаза кролика (мол. м. 150 000) — фирмы «Serva» (ФРГ).

Проводили электрофорез на бумге [16] и в 7% полиакриламидном геле (ПААГ) [17]. Изоэлектрическую точку препарата активатора плазминогена находили электрофокусированием в амфолине [18].

Ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-сефадексе А-50 и гель-фильтрацию через сефадекс G-200 при очистке активатора плазминогена осуществляли, как описано ранее [5]. Результаты подвергнуты статистической обработке [19].

Результаты и обсуждение

Активатор плазминогена выделяли из ФАП промывной крови с удельной активностью $2,54 \pm 0,20$ АЕ/мг. Фермент очищали фракционированием

Т а б л и ц а 1

Выделение и очистка активаторов плазминогена из ФАП промывной крови внезапно умерших

Этап фракционирования	Белок, мг	Активность активатора плазминогена			Кратность очистки
		удельная, АЕ/мг	общая, АЕ	выход, %	
ФАП промывной крови внезапно умерших (500 мл)	20 000	2,3	46 000	100	1
Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 0,45 насыщенности	8 750	4,3	37 600	82	1,9
Осаждение ZnSO_4 при концентрации 0,08%	4 600	7,2	33 100	72	3,1
Осаждение этиловым спиртом при концентрации 20 об. %	2 754	11,2	30 840	67	4,9
Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-50	741	36,0	26 680	58	15,6
Гель-фильтрация через сефадекс G-200	15	203,0	3 040	6,6	88,0

сульфатом аммония, сульфатом цинка, этиловым спиртом, а также хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50 и гель-фильтрацией через сефадекс G-200. Все операции проводили при 4°C. Результаты одного из 6 идентичных опытов представлены в табл. 1. Из 500 мл ФАП получено 15 мг препарата активатора плазминогена. Удельная активность его равна 203 АЕ/мг, что в 88 раз превышает таковую исходной плазмы (2,3 АЕ/мг). Выход фермента по белку составил 0,07%, по активности — 6,6%.

Активатор плазминогена по аналогичной схеме удалось выделить из ФАП цельной и вторично промывной крови внезапно умерших. Однако эти препараты имели более низкую удельную активность (85—108 АЕ/мг) и кратность очистки (26,6—31,8). Поэтому для анализа свойств использовали активатор плазминогена, полученный из плазмы промывной крови. Этот фермент является гликопротеидом, содержащим 2,4—2,5% углеводов. Спектр поглощения его, измеренный на спектрофотометре МРГ-2А фирмы «Hitachi»

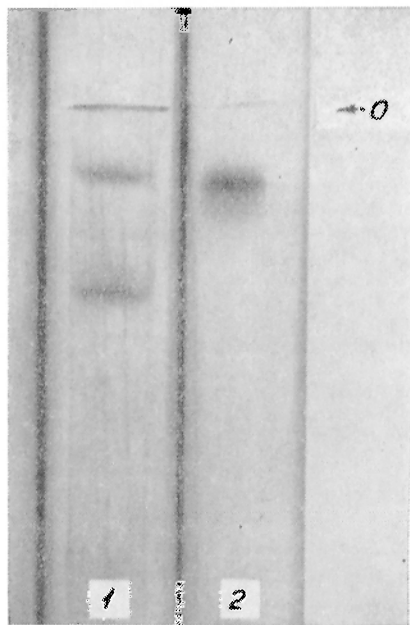


Рис. 1. Диск-электрофореграммы очищенных препаратов активатора плазминогена.

Условия опыта: трис-глициновый буфер рН 8,3, 7% полиакриламидный гель; размер трубок 0,5 × 7,0 см; сила тока 5 мА на трубку; продолжительность электрофореза 1 ч.
Обозначения: 0 — линия старта; 1 — активатор плазминогена; 2 — активатор плазминогена после реэлектрофореза.

(Япония), имеет единственный максимум при длине волны 280 нм. Изоэлектрическая точка фермента — при рН 6,2.

Препарат активатора плазминогена гомогенен при электрофорезе на бумаге, однако при электрофоретическом исследовании в 7% ПААГ обнаружены 2 фракции фермента. Одна из них соответствует по подвижности β-глобулинам, а другая — α₂-глобулинам ФАП крови внезапно умерших (рис. 1). Выявлено, что активаторной активностью обладает лишь фракция, мигрирующая в зоне β-глобулинов с электрофоретической подвижностью 0,20 по отношению к альбумину. На рис. 1 приведена также

электрофореграмма активатора плазминогена после реэлектрофореза в ПААГ.

Молекулярная масса фермента, определенная по калибровочному графику, составляет в среднем 70 000. Близкий результат получен Аоки и Каулла, которые тем же методом определяли молекулярную массу «сосудистого» активатора плазминогена, равную 65 000 [20] и 80 000 [21].

Активатор плазминогена термостабилен при инкубации от 0 до 50°C в течение 20 мин. Нагревание при 60°C (20 мин) снижает активность фермента на 20—30%. Полная инактивация его наблюдается при 75—80°C. Активность фермента устойчива в интервале рН инкубационной смеси от 5,0 до 8,0, а оптимальное ее значение определяется при рН 7,4.

Катионы Zn²⁺ и Cd²⁺ (в виде хлористых солей) необратимо подавляют действие активатора плазминогена, а Na⁺, K⁺, NH₄⁺ и Mg²⁺ несколько усиливают его активность. Ион Cu²⁺ значительно активизирует (на 25%) выделенный активатор плазминогена уже при концентрации соли 1·10⁻⁴ М. Аналогичное действие катионов Na⁺, Cu²⁺ и Zn²⁺ на тканевый активатор плазминогена из сердца свиньи описано Г. В. Андреевко и Л. А. Мигалиной [22].

Активатор плазминогена превращает как бычий, так и человеческий плазминоген в плазмин, что свидетельствует о его прямом (по типу урокиназы) и опосредованном (по типу стрептокиназы) механизме действия.

В целях получения ФАФ, обогащенной активатором плазминогена, разработан метод фракционирования ФАП этапом на холоду и при заданном значении рН. Сравнительный анализ активности компонентов фибринолитической системы ФАП промывной крови (2,6—9,4 ФЕ/мл) и выделенной из нее ФАФ представлен в табл. 2. Во фракции выявлены активатор плазми-

ногена, плазмин, плазминоген, удельная активность которых соответственно в 7,2, 5,0 и 3,3 раза выше, чем в исходной плазме. Общая фибринолитическая активность фракции увеличивается в среднем в 17,6 раза и обусловлена в основном активатором плазминогена, на долю которого приходится 94—98% активности. В ФАФ снижена активность ингибиторов фибринолиза, которая составляет 1,1% потенциала плазмы. Выход фракции по белку равен 2,6—5,5%, а по суммарной фибринолитической активности — $76,9 \pm 8,1\%$. Электрофорез на бумаге показал, что ФАФ представляет собой в основном β -глобулиновую фракцию плазмы крови: содержание β -глобулинов в ней увеличено в 5—7 раз, количество альбуминов снижено в 4—6 раз, практически отсутствуют α -глобулины (рис. 2).

ФАФ плохо растворяется в дистиллированной воде, хорошо — в 0,85% растворе NaCl, ограниченно — в боратном буфере pH 8,3, фосфатном буфере pH 7,4. Отмечено, что 0,85% NaCl подавляет фибринолитическую активность, выявляемую методом лизиса стандартного сгустка, но не влияет на определение активности методами фибриновых пластин, тромболизиса, ТЭГ. Растворы ФАФ сохраняют свою активность при комнатной температуре 16—18 ч, при 4°C — 24—30 ч.

Фракция обладает выраженной тромболитической активностью, которая зависит от дозы. ФАФ (10 ФЕ/мл) по тромболитическому эффекту на крови доноров аналогична препаратам стрептазы, стрептокиназы и вызывает 85—95% лизис стандартного кровяного сгустка за 4 ч инкубации (рис. 3). Анализ тромболитической активности стрептазы, ФАП и ФАФ на крови больных с тромбоэмболическими заболеваниями показал, что тромболитический эффект (процент лизиса кровяного сгустка больного) одного и того же препарата сильно варьирует: для стрептазы — 65—92%, для ФАП (6 ФЕ/мл) — 40—80%, для ФАФ (5 ФЕ/мл) — 16—92% и для ФАФ (10 ФЕ/мл) — 68—100%. Это, вероятно, зависит от состояния свертывающей и фибринолитической системы крови больного и указывает на необходимость подбора индивидуальной дозы фибринолитиков.

Таблица 2

Активность компонентов ФАП промывной крови и выделенной из нее ФАФ ($M \pm m$)

Компоненты фибринолитической системы крови	Активность					
	ФАП (3500 мг белка)			ФАФ (153 мг белка)		
	удельная, на 1 мг белка	суммарная	удельная, на 1 мг белка	суммарная	выход, %	кратность очистки
Общая фибринолитическая активность, мФЕ	$76,6 \pm 4,6$	$268 100 \pm 40 200$	$1 350 \pm 101$	$206 100 \pm 14 400$	$76,9 \pm 8,1$	$17,6 \pm 1,1$
Активатор плазминогена, АЕ	$0,90 \pm 0,05$	$3 150 \pm 228$	$6,5 \pm 0,2$	995 ± 91	$31,6 \pm 3,0$	$7,2 \pm 1,0$
Плазмин, ПЕ	$0,030 \pm 0,002$	105 ± 21	$0,150 \pm 0,004$	$22,9 \pm 3,4$	$21,8 \pm 1,5$	$5,0 \pm 1,2$
Плазминоген, мКЕ	$4,2 \pm 0,2$	$14 700 \pm 1 030$	$14,0 \pm 5,6$	2140 ± 740	$14,6 \pm 3,6$	$3,3 \pm 0,7$
Ингибиторы фибринолиза, ИЕ	$0,37 \pm 0,06$	$1 295 \pm 155$	$0,092 \pm 0,020$	$14,1 \pm 4,6$	$1,10 \pm 0,27$	$4,0 \pm 0,9$

Примечание. Представлены результаты 10 опытов.

Тромбоэластографическое исследование подтвердило литическую эффективность ФАФ при добавлении ее к крови больного с выраженной гиперкоагуляцией (рис. 4).

Кроме того, ФАФ проявляет антитромбиновое действие. Добавление ее к плазме донорской крови в концентрации 7,5—25 ФЕ/мл удлиняет

Рис. 2. Протеннограммы ФАП и выделенной из нее фракции.
1 — ФАП; 2 — ФАФ.

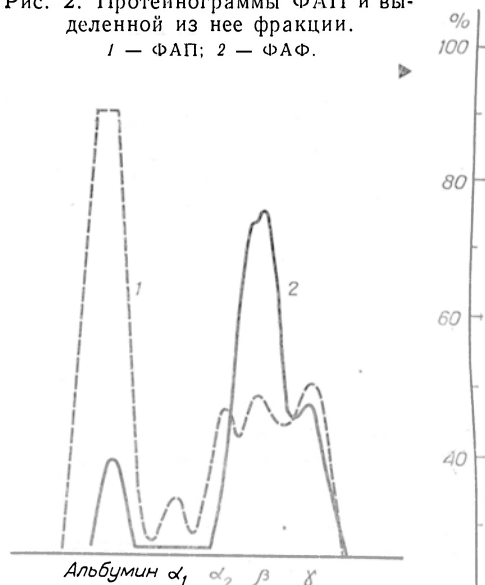
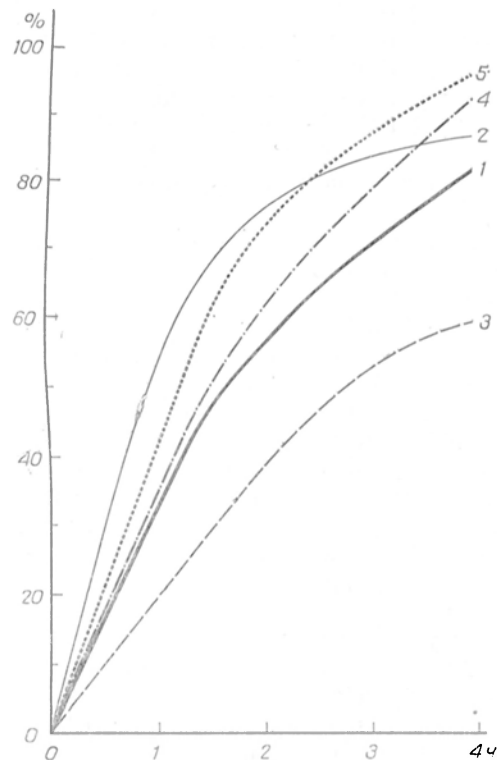


Рис. 3. Тромболитическая активность стрептазы, стрептокиназы, ФАФ.

1 — стрептаза, 2500 IE/мл; 2 — стрептокиназа, 2500 IE/мл; 3—5 — ФАФ, 5, 10 и 20 ФЕ/мл соответственно. По оси абсцисс — время инкубации (в ч); по оси ординат — лизис стандартного кровяного сгустка (в %).



тромбиновое время в 2—5 раз. При более высокой концентрации сгустка не образуется.

Однократное внутривенное введение ФАФ кроликам вызывало через 30 мин гипокоагуляционные изменения, которые выражались в удлинении

времени реакции и свертывания крови в 1,5 и 3,5 раза, уменьшении максимальной амплитуды на 20%, удлинении тромбинового времени плазмы крови в 2 раза. Значительного повышения фибринолитической активности крови выявлено не было. Через 60 мин отмечена тенденция к гиперкоагуляции. При увеличении дозы ФАФ до

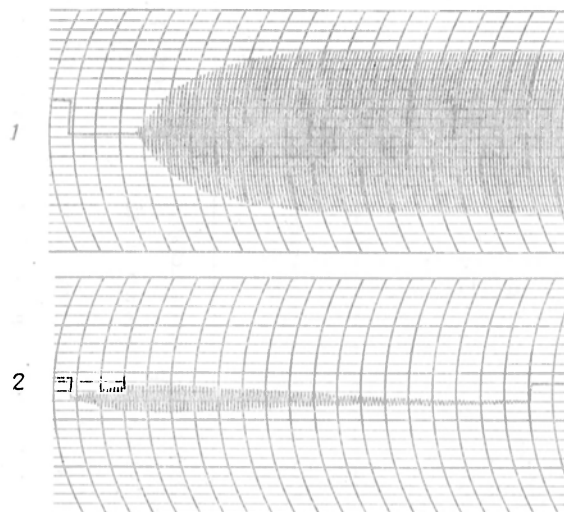


Рис. 4. Тромбоэластограммы крови больного К. до и после добавления в кювету тромбоэластографа 0,2 мл крови и 0,1 мл ФАФ.
1 — 0,85% NaCl; 2 — ФАФ, 15 ФЕ/мл.

1500—1800 ФЕ через 5—10 мин после введения отмечалась кровоточивость из мест прокола вены иглой. Концентрация фибриногена в крови изменялась незначительно.

В опытах *in vitro* установлена относительная видовая специфичность действия ФАФ. Ее общая фибринолитическая активность, определяемая на плазме крови кролика, была в 4—5 раз ниже, чем на плазме крови человека, а тромболитический эффект и антитромбиновое действие снижены в 2—3 раза. Полученные данные свидетельствуют о возможности получения из трупной крови лечебного препарата тромболитического действия, обогащенного активатором плазминогена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хватов В. Б., Платонова Т. К. — Пробл. гематол., 1976, № 3, с. 38—42. — 2. Левин Г. Я. — Там же, № 9, с. 14—17. — 3. Круть М. И., Парадеева И. К. — Там же, № 12, с. 30—32. — 4. Братчик А. М. — Там же, 1975, № 6, с. 18—22. — 5. Петренко О. А., Хватов В. Б. — Там же, 1976, № 12, с. 46—48. — 6. Гаврилов О. К. — В кн.: Современные проблемы тромбозов и эмболий. Тезисы 1-го Межинститутского симпозиума. М., 1978, с. 70—73. — 7. Андожская Н. В. Фибринолитические свойства посмертной крови. Автореф. дис. канд. М., 1974. — 8. Братчик А. М., Левандовский В. Б. — В кн.: Гистогенез и патоморфология тканевых структур. Харьков, 1973, с. 26—30. — 9. Пафомов Г. А. Биологическая характеристика крови внезапно умерших и ее использование в хирургической практике. Дис. докт. М., 1971. — 10. Зыкова К. И. — Прикл. биохим., 1966, № 5, с. 600—604. — 11. Хватов В. Б., Петренко О. А. — Пробл. гематол., 1975, № 6, с. 57—60. — 12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275. — 13. Шестаков В. А. — Лабор. дело, 1974, № 8, с. 501—502. — 14. Dubous H., Gilles K. A., Hamilton J. K. et al. — Analyt. Chem., 1956, v. 28, p. 350—351. — 15. Determann H., Michel W. — J. Chromatogr., 1966, № 25, p. 303—319. — 16. Гурвич А. Е. — В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1964, с. 110—123. — 17. Davis B. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, p. 404—427. — 18. Vesterberg O., Swensson H. — Acta chem. scand., 1966, v. 20, p. 820—834. — 19. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1967. — 20. Aoki N., von Kaulla K. N. — J. Lab. clin. Med., 1971, v. 78, p. 354—362. — 21. Aoki N. — J. Biochem. (Tokyo), 1974, v. 75, p. 731—741. — 22. Андреевко Г. В., Мигалина Л. А. — Биохимия, 1971, № 4, с. 685—689.

Поступила 5/IV 1978

CHARACTERIZATION OF HUMAN PLASMINOGEN ACTIVATOR AND OF THE BLOOD PLASMA FRACTION WITH FIBRINOLYTIC ACTIVITY, ENRICHED WITH PLASMINOGEN

T. K. Platonova, O. A. Petrenko

Department of Tissue Conservation and Transfusiology, N. V. Sklifosovsky Research Institute of Urgent Medical Service, Moscow

An activator of plasminogen with specific activity 203 AU/mg was isolated from blood plasma with fibrinolytic activity, obtained from blood of suddenly deceased patients. Specific activity of the plasminogen activator exceeded 88-fold the activity of the initial blood plasma. The protein was identified with a glycoprotein, similar to β -globulin; its molecular weight was 70,000 as shown by gel filtration; the isoelectric point was at pH 6.2. The plasminogen activator remained stable after heating up to 50°. Effects of pH in an incubation media and of cations on the activity of the plasminogen activator were studied. A fraction containing the fibrinolytic activity and enriched with plasminogen activator was obtained from the blood plasma after fractionation at low temperature with ethanol at definite pH value. The specific fibrinolytic activity in the fraction exceeded 17.6-fold the activity of blood plasma. The fraction exhibited high thrombolytic and antithrombin activities *in vitro*. It was similar to streptase and streptokinase preparations in its thrombolytic effect. Relative species specificity was found in studies of the fibrinolytic and antithrombin effects of the fraction containing fibrinolytic activity.

Н. Г. Волжина-Атабегова

АКТИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ЦИКЛА КРЕБСА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Дагестанский медицинский институт, Махачкала

Охлаждение крыс без применения наркотических веществ до ректальной температуры 33—35°C не влияет на активность окислительных ферментов цикла Кребса: изоцитрат-, α -кетоглутарат-, малат- и сукцинатдегидрогеназы, а также пируватдегидрогеназы. Глубокая гипотермия (19—20°C) приводит к уменьшению активности исследованных дегидрогеназ. Активность сукцинатдегидрогеназы снижается при этом в значительно меньшей степени, чем активность НАД-зависимых дегидрогеназ. Высказано предположение, что мозг крыс при охлаждении переходит на преимущественное использование сукцината.

В предыдущих исследованиях были изучены углеводные ресурсы, пусковые ферменты их превращения, а также основные пути их утилизации — гликолиз, дыхание и пентозный цикл в головном мозге на различных этапах переохлаждения теплокровных животных [1—3]. Показана фазовость перестройки метаболических процессов в головном мозге на этапах гипотермии, сопровождающаяся качественными и количественными изменениями взаимоотношений главных путей метаболизма углеводов, — основных энергетических субстратов мозга.

Протекание окислительных процессов в значительной степени зависит от ферментов цикла трикарбоновых кислот, являющегося завершающим этапом окислительных превращений в клетке. Однако в литературе имеются лишь единичные противоречивые данные, характеризующие состояние цикла Кребса в головном мозге при гипотермии [4—7]. Кроме того, результаты исследований различных авторов часто не могут быть подвергнуты сравнительному анализу, вследствие того что методика получения гипотермии была разной и общее физическое охлаждение часто сочеталось с предварительным введением наркотических и нейроплегических веществ.

В настоящей работе изучена активность дегидрогеназ цикла Кребса: изоцитратдегидрогеназы — ИДГ (КФ 1.1.1.41), малатдегидрогеназы — МДГ (КФ 1.1.1.37), α -кетоглутаратдегидрогеназы — КДГ (КФ 1.2.4.2), сукцинатдегидрогеназы — СДГ (КФ 1.3.99.1), а также пируватдегидрогеназы — ПДГ (КФ 1.2.4.1) в головном мозге на различных этапах охлаждения теплокровных животных.

Методы исследования

Исследования проведены на белых крысах массой 160—200 г. Охлаждение вызвали путем погружения животных в ванну с холодной водой и льдом без применения наркотических и нейроплегических веществ, которые резко изменяют протекание обменных процессов.

Наблюдения проведены поэтапно: при нормальной температуре тела (контроль), при снижении ее до ректальной температуры 33—35°C (стадия возбуждения) и при 19—20°C (стадия холодового наркоза).

Активность дегидрогеназ определяли по описанному методу [8] в модификации Ф. Е. Путилиной и Н. Д. Ещенко [9] и выражали в микрограммах диформаза на 1 мг белка за 1 ч. Белок определяли по Лоури [10].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования активности дегидрогеназ цикла Кребса в головном мозге контрольных и охлажденных крыс суммированы в таблице.

В головном мозге контрольных крыс активность СДГ значительно превышала активность всех остальных дегидрогеназ, что согласуется с результатами других исследований [9, 11, 12].

Снижение температуры тела до 33—35°C существенного влияния на активность КДГ и ИДГ не оказало. Активность МДГ и ПДГ снижается соответственно на 12 и 11,2%, однако это уменьшение активности статистически недостоверно. Напротив, активность СДГ в этих же условиях оказалась несколько выше, чем у контрольных крыс (на 13%).

Дальнейшее снижение температуры тела до стадии холодового наркоза (19—20°C) вызвало уменьшение активности всех изученных ферментов.

Активность дегидрогеназ цикла Кребса (в мкг диформаза на 1 мг белка за 1 ч) в головном мозге при гипотермии ($M \pm m$)

№ серии	Температура тела	МДГ	КДГ	ИДГ	СДГ	ПДГ
1	38°	11,1±0,42 (10)	12,5±0,5 (10)	14,7±0,71 (10)	76,6±2,45 (10)	16,2±0,71 (10)
2	33—35°	9,8±0,69 (7)	12,7±0,46 (7)	14,0±0,74 (7)	86,4±2,63 (7)	14,4±0,83 (7)
3	P_{1-2}	>0,5	>0,5	>0,5	$0,01 < P_{1-2} < 0,02$	>0,5
	19—20°	7,3±0,33 (7)	7,7±0,61 (7)	9,2±0,49 (7)	68,5±2,1 (7)	9,7±0,6 (7)
	P_{2-3} P_{1-3}	<0,01 <0,001	<0,001 <0,001	<0,001 <0,001	<0,001 $0,02 < P_{1-3} < 0,05$	<0,001 <0,001

Примечание. В скобках указано число исследований.

При анализе полученных данных установлено, что это уменьшение активности дегидрогеназ выражено различно. Активность СДГ в мозге при глубокой гипотермии снизилась в значительно меньшей степени, чем активность других дегидрогеназ цикла Кребса и ПДГ. Активность ПДГ, МДГ, КДГ и ИДГ снижается при переохлаждении на 35—40%, а активность СДГ — всего на 11% по сравнению с их уровнем в мозге контрольных крыс.

Интересно отметить, что снижение температуры тела в условиях наркоза или в условиях измененной газовой среды (гиперкапнии) также приводит к незначительному снижению активности СДГ на фоне резкого изменения активности других дегидрогеназ [4, 6, 13].

Отмеченные в наших исследованиях изменения активности окислительных ферментов ЦТК на этапах гипотермии могут быть обусловлены воздействием как нейрогуморальных, так и клеточных механизмов регуляции.

Одной из причин изменения активности окислительных ферментов ЦТК при охлаждении может быть влияние гипотермии на состояние апоферментов. При гипотермии обнаруживаются изменения состояния разнообразных функциональных групп белков мозга — амидных [14], сульфгидрильных [15], изменяется также способность белков мозга комплексоваться с другими компонентами клеток [16], что может оказать прямое воздействие на активность дегидрогеназ цикла Кребса.

Интересно отметить, что снижение активности дегидрогеназ ЦТК в головном мозге при гипотермии не приводит к возрастанию концентрации соответствующих субстратов, напротив, по данным некоторых исследователей [4, 17], содержание их либо снижается, либо остается без изменений.

Значительно меньшее по сравнению с другими дегидрогеназами угнетение активности СДГ в условиях глубокой гипотермии, а на начальных этапах ее активирование свидетельствуют о важной роли янтарной кислоты в энергообеспечении мозга в этот период. Это тем более важно, что гликолиз в связи с его значительно меньшей эффективностью не может обеспечить ткани мозга необходимое количество энергии для поддержания ее функций в условиях гипотермии: ранее нами было показано, что при глубоком охлаждении в мозге снижается как анаэробный, так и аэробный гликолиз.

Способность мозговой ткани в условиях низких температур использовать янтарную кислоту может зависеть от многих причин.

При гипотермии в тканях мозга возникает дефицит окисленного НАД [17, 18], одной из причин которого является снижение активности ферментов дыхательной цепи [19], что способствует переключению тканей мозга на окисление сукцината как ФАД-зависимого субстрата.

Другим моментом, способствующим, по нашему мнению, окислению сукцината в условиях низкой температуры, является связывание кетокислот (пирувата, оксалацетата, α -кетоглутарата) усиленно образуемым в этих условиях аммиаком [20, 21]. Нельзя не учитывать и возможность усиленного образования при гипотермии янтарной кислоты из гамма-аминомасляной (ГАМК). Возможно, что уменьшение содержания ГАМК в мозге при охлаждении [22] связано с усилением переаминирования (активность трансминаз в мозге охлажденных крыс остается высокой [23]) ее с α -кетоглутаратом с образованием янтарного полуальдегида, окисляющегося в сукцинат.

Нельзя исключить и гормональные влияния, которые могут оказать значительное воздействие на активность дегидрогеназ. В частности, глюкокортикоиды, количество которых в мозге при охлаждении повышено [24], способствуют лучшему проникновению сукцината через мембрану митохондрий и вызывают субстратную активацию СДГ, не оказывая существенного влияния на другие дегидрогеназы ЦТК [12].

Таким образом, можно думать, что и при гипотермии ткани головного мозга переходят на преимущественное использование янтарной кислоты, что можно рассматривать как компенсаторный механизм приспособления окислительного обмена к неблагоприятным воздействиям [25].



ЛИТЕРАТУРА

1. Векслер Я. И., Волжина - Атабегова Н. Г. — Изв. Северо-Кавказского науч. центра высш. школы. Серия. Естеств. науки, 1976, № 2, с. 86. — 2. Векслер Я. И., Атабегова Н. Г. — В кн.: Теоретические проблемы действия низких температур на организм. Владимир, 1972, с. 38. — 3. Волжина - Атабегова Н. Г. — Укр. біохім. ж., 1978, № 2, с. 188. — 4. Баев В. И., Друкина М. А., Валеева Г. А. и др. — Там же, 1975, № 3, с. 352. — 5. Елисеев В. А. — В кн.: Теоретические проблемы действия низких температур на организм. Л., 1969, с. 230. — 6. Stewart L. C., Zimny M. Z., West H. — J. Neurochem., 1970, v. 17, p. 285. — 7. Schwarz - Tienne E. — Rass. clinica-sci., 1958, v. 36, p. 177. — 8. Nordmann J., Nordmann R., Gaucher O. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, v. 33, p. 1826. — 9. Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д. — Вестн. Ленинград. ун-та, 1969, вып. 4, № 24, с. 119. — 10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265. — 11. Волкова З. А. Динамика некоторых показателей энергетического обмена в головном мозге и сердце крыс при адаптации к глубокой гипотермии и острой гипоксии. Автореф. дис. канд. Л., 1975. — 12. Ольский Г. Г. — В кн.: Нервная система. Л., 1974, вып. 14, с. 94. — 13. Карпов Б. А., Хлебущина Т. А. — В кн.: Теоретические и практические проблемы действия низких температур на организм. Л., 1975, с. 86. — 14. Векслер Я. И., Атабегова Н. Г. — В кн.: Проблемы биоклиматологии и климатофизиологии. Новосибирск, 1970, с. 94. — 15. Габитов М. М., Эмирбекова А. А. — Укр. біохім. ж., 1974, № 5, с. 602. — 16. Агафонова И. А. Взаимодействие мочевины с биоорганическими соединениями и ее динамика в мозгу при различных функциональных состояниях. Автореф. дис. канд. Ростов-н/Д., 1967. — 17. Näsegdal M., Naгр J., Siesjö B. K. — J. Neurochem., 1975, v. 24, p. 743. — 18. Горецкий Я., Марко Г., Пехань И. — Экспер. хир., 1968, № 6, с. 81. — 19. Хватова Е. М., Швец Н. А., Семенова Т. С. и др. — В кн.: Теоретические проблемы действия низких температур на организм. Владимир, 1972, с. 427. — 20. Векслер Я. И. Некоторые особенности метаболизма головного мозга при гипотермии. Автореф. дис. докт. Ростов-н/Д., 1963. — 21. Гасвская М. С. Биохимия мозга при умирании и оживлении организма. М., 1963. — 22. Щербачева Г. В. — Дскл. АН СССР, 1962, т. 146, с. 1213. — 23. Эмирбеков Э. З., Мукайлов М. И. — В кн.: Теоретические проблемы действия низких температур на организм. Владимир, 1972, с. 222. — 24. Сааков Б. А., Еремина С. А., Межера Э. П. — Там же, с. 154. — 25. Кондрашова М. Н. — В кн.: Митохондрии. Молекулярные механизмы ферментативных реакций. М., 1972, с. 151.

Поступила 21/IV 1978 г.

ACTIVITY OF BRAIN OXIDATIVE ENZYMES OF KREBS CYCLE IN HYPOTHERMIA

N. G. Volzhina-Atabegova

Dagestan Medical School, Makhachkala

Cooling of rats down to the rectal temperature of 33—35° without the use of narcotic and neuroplegic drugs did not cause distinct alterations in activity of the oxidative enzymes of tricarboxylic acid cycle — isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase, malate-, succinate- and pyruvate dehydrogenases in brain tissue. At the same time, inhibition of the activity of these dehydrogenases occurred in profound hypothermia (cooling to 19—20°). In this case the activity of succinate dehydrogenase was decreased less distinctly as compared with the activity of NAD-dependent dehydrogenases. Succinic acid appears to be an especially important substrate for oxidation in brain of the chilled rats.

УДК 615.355:577.152.143].015.2:615.31:547.751

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

ЗНАЧЕНИЕ ИСХОДНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ДЛЯ РАЗВИТИЯ АКТИВИРУЮЩЕГО ИЛИ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ИНДОЛИЛГИДРАЗИДОВ

Институт органической химии АН Армянской ССР, Ереван

*Изучено влияние гидразидов β -(2-метилиндолил-3)-пропионовой кислоты и дигидразидов α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)-пропионовой кислоты на активность моноаминоксидазы крыс *in vitro*. При торможении фермента предшествующим введением ипразида препараты закономерно активизируют дезаминирование серотонина. В пробах, не ингибированных ипразидом, активация наблюдается в единичных случаях. В опытах *in vivo* ипразид предупреждает изменения содержания аминов, вызываемые указанными препаратами в мозге крыс.*

Изучение влияния гидразидов β -(2-метилиндолил-3)-пропионовой кислоты гидразид-1 и дигидразидов α -бутил- β -(2-метил-5-карбоксииндолил-3)-пропионовой кислоты дигидразид-1 на моноаминоксидазу (МАО) мозга интактных животных позволило выявить определенную зависимость действия препаратов от исходного уровня активности фермента [1]. Было показано, что при низкой активности МАО препараты оказывают преимущественно активирующее действие.

Цель настоящего исследования — сопоставление влияния препаратов на активность МАО мозга интактных животных с их влиянием на активность фермента, ингибированного предварительным введением ипразида.

Методы исследования

Определение активности МАО. Использованы крысы-самцы массой 150—200 г. Крысам опытной группы за 18 ч до декапитации вводили подкожно ипразид в дозе 5 мг/кг. Контрольные животные получали физиологический раствор. Для изучения каждого препарата использовали 10—12 крыс, леченных ипразидом, и столько же интактных животных. Активность МАО определяли в 50% гомогенатах мозга, полученных, как описано ранее [2—4]. Исследуемые соединения преинкубировали с гомогенатами в течение 30 мин: гидразид-1 в дозе 0,5 мкмоль и дигидразид-1 в дозе 1 мкмоль. Субстраты серотонин (5-ОТ) креатининсульфат («Gee Lawson Chemicals, LTD») и норадреналин (НА) гидротартрат (Харьковский завод эндокринных препаратов) добавляли к пробам по 10 и 20 мкмоль соответственно из расчета на основании. Для каждого гомогената определяли интенсивность дезаминирования субстратов в пробах, преинкубированных с препаратом и без него. Состав инкубационной среды, условия инкубации и фиксации проб не отличались от описанных ранее [3, 4]. Содержание белка в гомогенатах определяли по Кьельдалю [2, 5].

Среднюю скорость дезаминирования рассчитывали по количеству образующегося аммиака в наномолях на 1 мг белка в 1 мин. Для каждого гомогената определяли V_0 — скорость дезаминирования в пробах, не содержащих препарата (исходная скорость); V — скорость дезаминирования в пробах, преинкубированных с препаратами,

и соотношение V/V_0 , отражающее изменение активности MAO. Исходные скорости нанесены на графики как $10/V_0$, соотношение V/V_0 нанесено по логарифмической шкале.

Определение содержания 5-ОТ и НА в гомогенатах мозга. Крысам подкожно вводили ипразид в дозе 5 мг/кг. Через 18 ч также подкожно вводили гидразид-I или дигидразид-I по 10 и 25 мг/кг соответственно. Через 1 ч после введения препаратов животных декапитировали. Амины выделяли из гомогенатов мозга методом ионообменной хроматографии на смоле Амберлит IRC-50, Na^+ форма, как описано ранее [6—8]. Средние данные высчитаны из 3—6 опытов. Результаты опытов обрабатывали по Стьюденту — Фишеру.

Результаты и обсуждение

Ипразид в дозе 5 мг/кг не вызывает значительных изменений активности MAO: через 18 ч после его введения дезаминирование 5-ОТ угнетено в среднем на 30%, а НА — на 17%.

При сопоставлении средних значений V_0 и V в контрольной группе и в группе животных, леченных ипразидом, отмечено следующее. Гидразид-I, преинкубированный в дозе 0,5 мкмоль с гомогенатами мозга интактных крыс, не оказывает существенного влияния на дезаминирование 5-ОТ: средние значения V_0 и V равны соответственно 6,96 и 6,65 нмоль аммиака на 1 мг

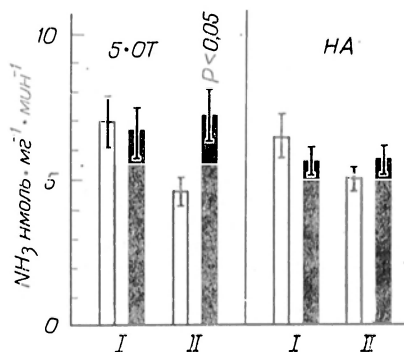


Рис. 1. Влияние гидразида-I на активность MAO мозга крыс, получавших ипразид.

За 18 ч до декапитации животным вводили: I — физиологический раствор, II — ипразид в дозе 5 мг/кг. Гидразид-I в дозе 0,5 мкмоль преинкубирован с гомогенатами мозга в течение 30 мин. Количество субстратов: 5-ОТ — 10 мкмоль, НА — 20 мкмоль. Белые столбики — V_0 , черные — V . Вертикальные линии — стандартные ошибки.

белка в 1 мин. В то же время преинкубация препарата с ингибированным ранее ферментом способствует резкому усилению дезаминирования 5-ОТ. Как видно на рис. 1, средняя скорость реакции возрастает с 4,57

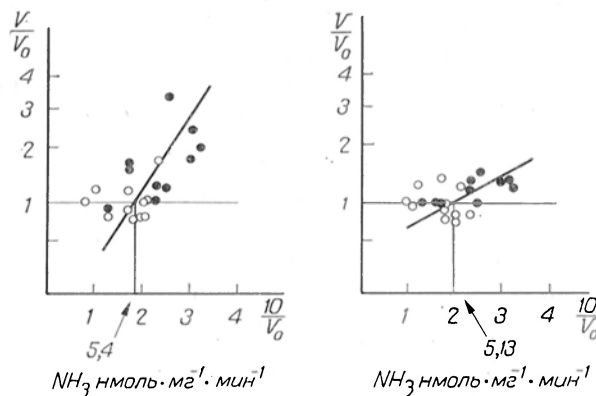


Рис. 2. Зависимость активирующего действия индолилгидразидов от исходной активности MAO.

Гидразид-I в дозе 0,5 мкмоль (слева) и дигидразид-I в дозе 1 мкмоль (справа) преинкубировали с гомогенатами мозга крыс в течение 30 мин. Субстрат — 5-ОТ, 10 мкмоль. Зачерненные круги — MAO мозга крыс, леченных ипразидом (5 мг/кг) за 18 ч до декапитации; незачерненные круги — MAO контрольных, нелеченных ипразидом животных. V_0 — исходная скорость дезаминирования, V — скорость дезаминирования после преинкубации гомогенатов с препаратами.

до 7,23 нмоль на 1 мг белка в 1 мин. Как видно на рис. 2, в группе интактных животных препарат усиливает дезаминирование в 3 пробах из 10, тогда как на фоне угнетения MAO активирующее действие зарегистрировано в 8 пробах. В обеих группах в подавляющем большинстве случаев активация MAO развивалась в тех гомогенатах, в которых V_0 была ниже или около 5,40 нмоль на 1 мг белка в 1 мин. Более того, чем меньше значения V_0 , тем сильнее выражена активация (см. рис. 2).

Дигидразид-I, преинкубированный в дозе 1 мкмоль с гомогенатом мозга интактных животных, слегка угнетает дезаминирование 5-ОТ, тогда как в гомогенатах мозга крыс, леченных ипразидом, препарат слабо активизирует реакцию дезаминирования. Как видно на рис. 2, в условиях торможения MAO в 6 опытах из 10 дигидразид-I активизирует фермент и в 4 опытах не оказывает действия. В контрольной группе активация отмечена в 3 случаях, торможение наблюдается в 5, в 3 опытах препарат не изменяет активности MAO. Активирующее действие дигидразида-I наблюдалось чаще в тех пробах, в которых V_0 дезаминирования 5-ОТ была ниже или около 5,13 нмоль на 1 мг белка в 1 мин.

Гидразид-I в дозе 0,5 мкмоль угнетает дезаминирование НА в гомогенатах мозга интактных животных и активизирует у крыс, леченных ипразидом (см. рис. 1). Однако оба эффекта недостоверны. Такое же действие на дезаминирование НА оказывает дигидразид-I в дозе 1 мкмоль.

Влияние ипразида на изменение содержания аминов, вызываемое гидразидом-I и дигидразидом-I, в мозге крыс

Вводимый препарат	5-ОТ, мкг/г		НА, мкг/г	
	без ипразида	после введения ипразида	без ипразида	после введения ипразида
Физиологический раствор	$0,35 \pm 0,005$	$0,43 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,01$
Гидразид-I, 10 мг/кг	$0,42 \pm 0,001$	$0,42 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,03$
<i>P</i>	$<0,001$		$<0,05$	
Физиологический раствор	$0,39 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$
Дигидразид-I, 25 мг/кг	$0,42 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,001$	$0,42 \pm 0,04$
<i>P</i>			$<0,002$	

Примечания. Ипразид введен в дозе 5 мг/кг за 18 ч до введения препаратов. Препараты введены за 1 ч до декапитации. Все инъекции подкожные. Число животных в группах 3—6.

Как видно из таблицы, введение интактным крысам гидразида-I по 10 мг/кг вызывает небольшое, но достоверное повышение содержания НА в ткани мозга. Через 18 ч после введения ипразида по 5 мг/кг отмечено небольшое повышение содержания 5-ОТ в мозге, тогда как количество НА не изменяется. В отличие от контрольных животных у крыс, получавших ипразид, введение гидразида-I не сопровождается изменением содержания аминов в мозге.

Дигидразид-I, введенный в дозе 25 мг/кг интактным крысам, не влияет на содержание 5-ОТ в мозге, но снижает уровень НА. У леченных ипразидом животных препарат не истощает запасы амина (см. таблицу).

Таким образом, в условиях торможения MAO, вызванного введением ипразида, активирующее действие гидразида-I и дигидразида-I на дезаминирование 5-ОТ проявляется довольно закономерно. В гомогенатах, в которых MAO не ингибирована ипразидом, активация при прочих равных условиях наблюдается лишь в отдельных случаях. Особенно отчетливо выражена активация после взаимодействия ингибированного фермента с гидразидом-I. Препарат не вызывает «сверхактивацию», а как бы «нормализует» активность MAO (см. рис. 1). Судя по изменению содержания аминов в мозге, имеется определенный антагонизм между ипразидом и исследуемыми препаратами (см. таблицу).

Ранее при изучении активирующего действия индолилгидразидов на MAO митохондрий мозга интактных крыс был отмечен некоторый «критический» уровень активности фермента, при отклонении от которого в ту и в другую сторону наиболее вероятно развитие угнетения или активации [1]. Как показано выше, при использовании гомогенатов мозга активация дезаминирования 5-ОТ исследуемыми препаратами не превышает 5,13 и 5,40 нмоль на 1 мг белка в 1 мин. Введение ипразида в дозе 5 мг/кг

обеспечивает через 18 ч именно такое торможение дезаминирования 5-ОТ, при котором активирующее действие препаратов проявляется с наибольшим постоянством. Приведенная выше схема опыта может быть использована как модель для отбора и изучения активаторов MAO и активирующей фазы действия ее ингибиторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С., Арзанунц Э. М. — *Вопр. мед. химии*, в печати. — 2. Кривченкова Р. С., Романова Л. А. — *Фармакол. и токсикол.*, 1966, № 3, с. 313. — 3. Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С. — *Биол. ж. Армении*, 1970, № 9, с. 31. — 4. Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С. — *Вопр. мед. химии*, 1970, № 6, с. 623. — 5. Горкин В. З., Татьяненко Л. В., Суворов Н. Н. и др. — *Биохимия*, 1967, № 5, с. 1036. — 6. Сафразбекян Р. Р., Арзанунц Э. М. — *Лаб. дело*, 1977, № 4, с. 226. — 7. Fleming R. M., Clark W. — *Analyt. Chem.*, 1965, v. 37, p. 692. — 8. Bertler A., Carlsson A., Rosengren E. — *Acta physiol. scand.*, 1958, v. 44, p. 273.

Поступила 21/IV 1978 г.

THE ROLE OF INITIAL ACTIVITY OF MONOAMINE OXIDASE IN DEVELOPMENT OF ACTIVATING OR INHIBITORY EFFECTS OF INDOLYL HYDRAZIDES

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

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

Effects of β -(2-methyl indolyl-3) propionic acid hydrazide and α -butyl- β -(2-methyl-5-carboxy indolyl-3) propionic acid hydrazide on the activity of monoamine oxidase were studied in rat brain *in vitro*. The compounds activated distinctly serotonin deamination under conditions of the enzyme inhibition, caused by pretreatment with iproniazide. The activation occurred only in the samples, which were not inhibited with iproniazide. The treatment with iproniazide prevented any alterations in content of amines, caused by the compounds in the rat brain *in vivo*.

УДК 612.33.015.2:612.397.23:547.392.52

А. Т. Аствацатурьян, И. М. Ставиский, А. Е. Губарева, Е. К. Алимова

БИОСИНТЕЗ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ТОНКОЙ КИШКЕ КРЫС

Кафедра биохимии Ростовского медицинского института, Ростов-на-Дону

С целью изучения возможности синтеза арахидоновой кислоты эпителием слизистой оболочки тонкой кишки были проведены исследования *in vitro* с гомогенатами слизистой оболочки крыс и *in vivo* на изолированной петле проксимального отдела подвздошной кишки собаки. В качестве предшественников использовали линолевую кислоту и $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат. Прямыми опытами *in vitro* и косвенно *in vivo* доказано наличие ферментных систем в эпителии слизистой оболочки тонкой кишки, осуществляющих удлинение и десатурацию линолевой кислоты до арахидоновой.

В последнее десятилетие получены данные, характеризующие слизистую оболочку тонкой кишки как ткань с активной биосинтетической функцией, направленной на преобразование всасывающихся веществ и образование de novo разнообразных компонентов животных организмов. Это значительно углубляет наши представления о роли тонкой кишки, основной функцией которой ранее считалось лишь всасывание питательных веществ. Установлено, что в слизистой оболочке кишки происходит активный биосинтез различных классов липидов: ацилглицеринов, фосфолипидов, холестерина и его эфиров [1]. В 1960 г. были получены сведения о способности осаждаемой и супернатантной фракций тонкой кишки быка синтезировать жирные кислоты, однако только в 1966 г. было окончательно доказано присутствие в этой ткани ферментных систем, осуществляющих биосинтез насыщенных и моноеновых кислот [2]. Биосинтез полиеновых жирных кислот до

настоящего времени в слизистой оболочке кишки не обнаружен, хотя можно предположить важность этого процесса для функции стенки кишечника, обеспечивающего ее адаптационные возможности при различных воздействиях окружающей среды. Например, проницаемость мембран клеток слизистой оболочки для различных продуктов пищеварения зависит от содержания и структуры полиеновых кислот в молекулах фосфолипидов. Активность ферментов, ассоциированных с мембранами, также зависит от жирнокислотного состава липидов мембран. Известно, что изменения температуры окружающей среды сопровождаются у животных изменениями в составе жирных кислот, что должно быть связано с направленностью и активностью их биосинтеза непосредственно в ткани, активно отвечающей на эти воздействия.

Сравнительно недавно выявлена наиболее важная и универсальная функция основной по проявлению эссенциальной активности полиеновой кислоты животных организмов — арахидоновой. Установлено, что эта кислота является непосредственным предшественником в биосинтезе простагландинов [3, 4], гормонов местного действия, регулирующих, в частности, тонус гладкой мускулатуры и секреторную активность кишечника [5]. Арахидоновая кислота имеется в липидах мембран клеток различных органов, однако неизвестно, синтезируется ли она непосредственно в этих тканях или же доставляется кровью из печени, активно синтезирующей все полиеновые кислоты, в том числе и арахидоновую кислоту из эссенциальных предшественников [6].

До настоящего времени предполагали, что арахидоновая кислота плазмы крови образуется только в печени и содержание ее в крови зависит от активности ферментных систем печени и количества эссенциальных кислот, поступающих в организм с пищей. Недавно появились косвенные указания на возможность биосинтеза арахидоновой кислоты в тромбоцитах крови, головном мозге взрослых крыс, фибробластах, сердце, почках, надпочечниках [7, 8].

В результате всасывания продуктов переваривания липидов растительного происхождения, фосфолипидов, поступающих в просвет кишечника с желчью и смываемых эпителием, в клетки слизистой оболочки тонкой кишки в значительном количестве поступает субстрат для биосинтеза арахидоновой кислоты — линолевая кислота. Вместе с тем микрофлорой кишечника активно синтезируется активатор процесса удлинения линолевой кислоты — коэнзим А.

В связи с вышеизложенным нам представлялось перспективным изучение возможности биосинтеза арахидоновой кислоты в слизистой оболочке кишечника, что и явилось задачей настоящего исследования. ■



М е т о д и к а

■ Исследование биосинтеза арахидоновой кислоты гомогенатом слизистой оболочки тонкой кишки проводили в три этапа. В качестве субстрата использовали линолеовую кислоту и 2-¹⁴C-ацетат.

1-й этап — окислительная десатурация C_{18:2} [9, 12]. Слизистую оболочку тонкой кишки гомогенизировали в среде, содержащей (в ммоль): АТФ — 4,0, КоА — 0,2, НАДФ·Н — 0,83, НАД·Н — 1,67, MgCl₂ — 1,5, ГSH — 4,5, никотинамид — 1,0, NaF — 1,25, NaCN — 3,0, фосфатный буфер (рН 7,0) — 125 в 0,15 М КСl и 0,25 М сахарозе. Гомогенат (2 г) помещали в инкубационную колбу с 10 мм линолевой кислоты, растворенной в 500 мм пропиленгликоля. Колбу заполняли кислородом и инкубировали при встряхивании 20 мин при 37°C.

2-й этап — удлинение цепи 18 : 3 [6, 9, 12]. К инкубационной среде добавляли 3,0 мл раствора, содержащего (в ммоль): АТФ — 4,0, КоА — 0,2, НАДФ·Н — 2,0, НАДФ — 1,0, цистеин — 30,0, Гл-6-ф — 10,0, малонат — 30,0 биотин — 0,1, MgCl₂ — 10,0, КНСО₃ — 30,0, 2-¹⁴C-ацетат — 30,0, фосфатный буфер (рН 7,0) — 125 в 0,15 М КСl и 0,25 М сахарозе. Кислород вытесняли из колбы азотом и проводили инкубацию при встряхивании 25 мин при 37°C.

3-й этап — окислительное дегидрирование 20 : 3 [8, 11, 14]. К инкубационной среде добавляли 2,0 мл раствора, содержащего (в ммоль): АТФ — 10,0 КоА — 0,2, НАДФ·Н — 2,0, MgCl₂ — 10,0, Гл-6-ф — 20,0, цистеин — 10,0, фосфатный буфер

(рН 7,0) — 125 в 0,15 М КСl и 0,25 М сахарозе. Инкубацию проводили 20 мин в атмосфере кислорода при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 200,0 мл смеси хлороформ : метанол (2 : 1). Экстракцию липидов проводили трижды.

Опыты по исследованию биосинтеза арахидоновой кислоты в слизистой оболочке тонкой кишки *in vivo* проводили на собаках. С этой целью изолировали петлю проксимальной части подвздошной кишки и питающую ее артериовенозную ветвь. Внутриартериально вводили 1 мМ ¹⁴C-ацетата. В момент инфузии артерию выше места введения перекрывали. После введения метчика в течение 1 1/2 ч собирали кровь, выделяющуюся из вены, отводящей кровь от данного отрезка кишечника. Сыворотку крови отделяли и из нее экстрагировали липиды. Включение метки регистрировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика.

Липиды экстрагировали по описанному методу [9], подвергали холодному гидролизу [10], полученные жирные кислоты метилировали 0,7 н. Н₂SO₄ в метаноле [11]. Состав липидов слизистой оболочки исследовали методом тонкослойной хроматографии на силикагеле с 13% гипса в системах для разделения фосфолипидов (хлороформ : метанол : вода — 65 : 25 : 4) и нейтральных липидов (гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота — 80 : 20 : 2). Проявление фракций проводили в парах йода. Идентификацию

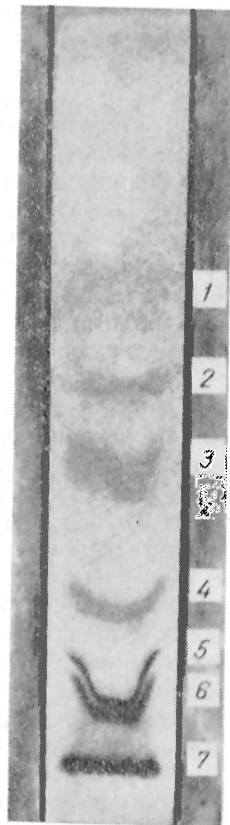


Рис. 1. Тонкослойная хроматограмма метиловых эфиров высших жирных кислот по степени ненасыщенности.

1 — насыщенные; 2 — моноеновые; 3 — диеновые; 4 — триеновые; 5 — тетраеновые жирные кислоты; 6 — неидентифицированная фракция; 7 — стартовая линия. Окраска раствором фосфорно-молибденовой кислоты.

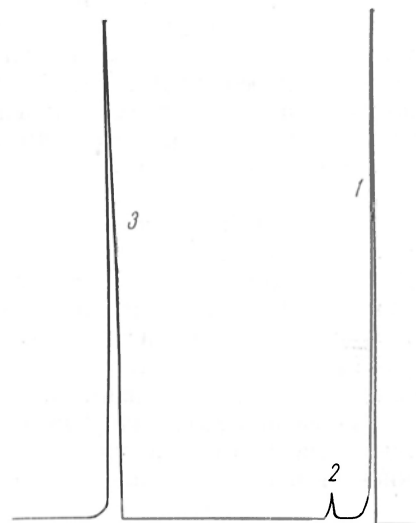


Рис. 2. Хроматограмма метиловых эфиров высших жирных кислот.

1 — фронт растворителя; 2 — пальмитиновая кислота; 3 — арахидоновая кислота.

фикацию фракций осуществляли с помощью метчиков и цветных реакций на функциональные группы липидов [12]. Для препаративного разделения метиловых эфиров высших жирных кислот по степени ненасыщенности использовали метод тонкослойной хроматографии на силикагеле с гипсом, импрегнированным AgNO₃ (11%) в системе гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота 90 : 10 : 2 (рис. 1). Для проявления зон метиловых эфиров использовали родамин 6ж, 0,1% водным раствором которого опрыскивали краевые участки хроматограмм. Участки силикагеля, содержащие метиловые эфиры, снимали, последние экстрагировали метанолом и исследовали их радиоактивность. Чистоту разделения метиловых эфиров проверили методом газожидкостной хроматографии (рис. 2). Состав метиловых эфиров высших жирных кислот исследовали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе марки «Цвет-4» на капиллярной колонке. В качестве неподвижной фазы использовали полипропиленгликольадипинат. Для расчета количественного содержания метиловых эфиров использовали метод Л. В. Андреева [13]. Идентификацию метиловых эфиров высших жирных кислот проводили ранее описанными методами [14].

Результаты и обсуждение

Исследования биосинтеза арахидоновой кислоты гомогенатом слизистой оболочки тонкой кишки при использовании в качестве субстрата линолевой кислоты и $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата являются наиболее доказательными. После инкубации гомогенатов слизистой оболочки с необходимыми субстратами исследовали включение метки в различные фракции липидов. Основная часть метки оказалась включенной в высшие жирные кислоты, полученные после гидролиза общих липидов слизистой оболочки. Среди жирных кислот наибольшая радиоактивность обнаруживалась в арахидоновой кислоте (табл. 1), однако и в остальных семействах кислот найдено включение метки, что свидетельствует о присутствии в слизистой оболочке кишечника ферментных систем, осуществляющих синтез насыщенных жирных кислот, и об активности процессов десатурации, приводящих к накоплению моноеновых (16 : 1, 18 : 1) и диеновых кислот, в основном 18 : 2 [6, 9]. Приведенные выше данные позволяют утверждать, что в слизистой оболочке тонкой

Таблица 1

Распределение радиоактивности в группах жирных кислот липидов гомогената слизистой оболочки тонкой кишки крыс

Кислоты	Радиоактивность, имп/с/мг
Насыщенные	12,1±0,35
Моноеновые	2,7±0,12
Диеновые	16,1±0,76
Тетраеновые	60,5±1,74

Таблица 2

Распределение радиоактивности в группах жирных кислот липидов сыворотки крови, питающей изолированную петлю подвздошного отдела тонкой кишки собаки

Кислоты	Радиоактивность, имп/с/мг
Насыщенные	256,0±1,50
Моноеновые	42,0±0,35
Диеновые	7,3±0,04
Тетраеновые	17,3±0,12

кишки идет активный синтез арахидоновой кислоты в присутствии достаточного количества субстрата для этого процесса — линолевой кислоты. Радиоактивность обнаружена и в фракции неомыляемых липидов, представленных в основном холестерином, что подтверждает опубликованные ранее данные.

Биосинтез арахидоновой кислоты исследовали также в опытах на собаках. В жирных кислотах липидов, полученных из сыворотки венозной крови, оттекающей от данной петли, исследовали распределение метки (табл. 2). Как и в опытах с гомогенатами слизистой оболочки, метка была обнаружена во всех семействах кислот: насыщенных, моноеновых, диеновых, арахидоновой. Результаты этого опыта подтверждают биосинтез арахидоновой кислоты *in vivo* в слизистой оболочке кишечника, однако эти доказательства носят косвенный характер, так как метка вводилась непосредственно в кровь и не исключена возможность биосинтеза арахидоновой кислоты ферментными элементами крови [7, 15].

При сравнении результатов исследования биосинтеза арахидоновой кислоты *in vivo* и *in vitro* выявляется резкая разница в интенсивности образования отдельных семейств жирных кислот. Так, в опытах *in vitro*, где в качестве субстратов использовали и линолевую кислоту растительного происхождения (18 : 2_(9, 12)) и $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат, наибольшее включение метки, свидетельствующее о высокой скорости биосинтеза, происходило в арахидоновую кислоту (см. табл. 1). В опытах *in vivo* в качестве субстрата для биосинтеза вводили только $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат; следовательно, элонгации и десатурации могли подвергаться только те молекулы линолевой кислоты (18 : 2_(9, 12)), которые находились к моменту опыта в клетках слизистой оболочки кишечника. Вероятно, именно недостатком основного субстрата для биосинтеза арахидоновой кислоты объясняются результаты опыта

in vivo (см. табл. 2), показывающие значительно более низкую скорость включения метки в $C_{20:4}$, по сравнению с опытами in vitro. Отсутствие поступления линолевой кислоты с пищей может являться фактором, ограничивающим скорость биосинтеза арахидоновой кислоты в слизистой оболочке тонкой кишки животных и человека.

Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о способности слизистой оболочки тонкой кишки различных животных синтезировать арахидоновую кислоту из эссенциальных предшественников. Как известно, арахидоновая кислота как в свободной форме, так и в составе молекул фосфолипидов, ацилглицеринов, эфиров холестерина включается в липопротеиды — транспортные формы липидов, образуемые слизистой оболочкой тонкой кишки. В таком виде арахидоновая кислота переносится кровью в другие ткани и органы животных организмов. Следовательно, можно постулировать, что благодаря способности к синтезу арахидоновой кислоты слизистая оболочка тонкой кишки наряду с печенью участвует в обеспечении различных тканей и органов животных организмов арахидоновой кислотой.

Способность слизистой оболочки кишечника синтезировать различные высшие жирные кислоты, фосфолипиды, холестерол и его эфиры, вероятно, является одним из факторов регуляции пищеварительной и всасывательной функций кишечника, так как состав липидов влияет на активность ферментов, ассоциированных с мембранами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gangl A., Osner H. — *Gastroenterology*, 1975, v. 68, p. 167. —
2. Franks J. J., Riley E. M., Isselbacher K. J. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1966, v. 121, p. 322. —
3. Van Dorp D. A., Burthuis R. K., Nugteren D. J. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1964, v. 90, p. 204. —
4. Anggard E. H., Samuelsson B. — *J. biol. Chem.*, 1965, v. 240, p. 3518. —
5. Andersen N. H., Ramwell P. R. — *Arch. intern. Med.*, 1974, v. 133, p. 30. —
6. Alfin-Slater R., Atergood L. — *Physiol. Rev.*, 1966, v. 48, p. 758. —
7. McGregor L., Renaud S. — *Nutr. a. Metabol.*, 1976, v. 20, p. 185. —
8. Coniglio J. G., Buch D. H., Grogan W. L. — *Lipids*, 1976, v. 11, p. 143. —
9. Folch J., Lees H., Sloane-Stanly G. — *J. biol. Chem.*, 1957, v. 226, p. 497. —
10. Enser M., Bartley J. — *Biochem. J.*, 1962, v. 88, p. 607. —
11. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. М., 1965. —
12. Кейтс М. Техника липидологии. М., 1975. —
13. Андреев Л. В., Афанасьев М. И., Чаброва О. Г. и др. — *Успехи химии*, 1965, т. 34, № 5, с. 921. —
14. Алимова Е. К., Аствацатурьян А. Т. — *Исследование жирных кислот и липидов методом хроматографии*, М., 1967. —
15. Bills T. K., Smith J. B., Silver M. J. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 424, p. 309.

Поступила 22/IV 1978 г.

BIOSYNTHESIS OF ARACHIDONIC ACID IN RAT SMALL INTESTINE

A. T. Astvatsatur'yan, I. M. Stavisky, A. E. Gubareva, E. K. Alimova

Chair of Biochemistry, Medical School, Rostov-on-Don

Ability of epithelium of rat small intestine mucose to synthesize arachidonic acid was studied in vivo and in vitro. Linoleic acid and $2^{14}C$ -acetate were used as precursors. The fatty acids were fractionated using thin-layer chromatography on silica gel impregnated with $AgNO_3$. The label was incorporated into all the fractions but the highest radioactivity was found in the fraction of arachidonic acid; this suggests that the enzyme systems, carrying out the synthesis of polyenic fatty acids, occur in the mucosa of small intestine.

А. В. Мужиченко, О. Н. Никольская, Г. А. Хардина

ГЕПАТОТОКСИЧНОСТЬ ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БРЮШНОТИФОЗНЫХ БАКТЕРИЙ

Кафедра биохимии и проблемная лаборатория кафедры госпитальной терапии Волгоградского медицинского института

Обнаружено существенное повышение количества общих липидов в ткани печени мышей после внутривнутрибрюшинного введения липида А и общего липидного экстракта (липид Б) из липополисахаридов (ЛПС) брюшно-тифозных бактерий. Отмечено значительное увеличение количества триацилглицеринов в печени начиная с 3 ч от начала действия препаратов. К концу суток содержание нейтрального жира в 3 раза превышало исходное. Липид А вызывал появление моно- и диацилглицеринов. Показано сходство в действии липидов ЛПС на содержание общих фосфолипидов, гликолипидов и эфиров холестерина. Характер изменений в содержании отдельных липидов печени под действием липидных компонентов ЛПС был во многом аналогичным вызванному целым эндотоксином.

Изучение биологических свойств липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий показало, что одним из признаков интоксикации является ожирение печени у чувствительных к эндотоксинам животных [1, 2]. Было выяснено [3], что развитие токсического ожирения печени связано главным образом с накоплением триглицеридов. Механизм такого действия ЛПС остается пока неясным. В последние годы получены данные об особой роли липидного компонента ЛПС в возникновении токсических изменений в организме животных [4—8]. По мнению большинства авторов, роль «токсического центра» молекулы эндотоксина играет липид А. Именно этот компонент несет ответственность за многие свойства целого ЛПС. В настоящей работе получены данные о влиянии липида А и общих липидов, полученных из ЛПС брюшно-тифозных бактерий, на содержание общих и нейтральных липидов в печени мышей.

М е т о д и к а

Опыты проводили на 7-недельных самцах белых мышей весом $22,0 \pm 1,4$ г. Условия проведения экспериментов, методы оценки содержания липидов в печени животных, а также способы получения липидных препаратов из ЛПС брюшно-тифозных бактерий и их введения описаны ранее [3, 9]. Липидные компоненты ЛПС вводили в дозе 125 мкг на мыш. Эта доза не вызывала появления внешних признаков интоксикации, наблюдаемых после введения целого ЛПС. Анализ содержания общих липидов, общих фосфо- и гликолипидов, а также индивидуальных фракций нейтральных липидов — триацилглицеринов, моно- и диацилглицеринов, неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), свободного и эстерифицированного холестерина (ХС) — проводили через 3,6 и 24 ч после введения липидных препаратов ЛПС брюшно-тифозных бактерий. Данные о содержании общих липидов и отдельных их фракций в мг на 1 г сухой ткани сопоставляли с результатами изучения аналогичных показателей у контрольных животных. Материалы подвергали статистической обработке.

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

Как видно из табл. 1, введение липида А приводило к существенному увеличению количества общих липидов в печени. Начиная с 6 ч, повышенный уровень сохранялся до конца суток.

Наибольшим изменениям подвергалось содержание нейтральных липидов, уровень которых уже через 3 ч после введения препарата повышался в 2 раза. Через 24 ч содержание нейтральных липидов превышало исходное в 3 раза.

Отмечено некоторое возрастание количества общих фосфолипидов (Фл) через 6 ч после введения липида А. К концу суток уровни Фл у опытных и контрольных мышей не различались. Количество гликолипидов в печени

к 6 ч действия липида А понижалось, но к 24 ч возвращалось к исходному. В табл. 2 приведены данные о влиянии липида Б на содержание общих липидов печени животных. Изменения в содержании нейтральных липидов, ФЛ и гликолипидов оказались во многом сходными с происходящими под влиянием липида А. Следует отметить более раннее и более выраженное понижение количества гликолипидов под действием липида Б, которое к концу суток сменялось существенным ($P < 0,01$) повышением по сравнению с контролем. Сведения о содержании отдельных фракций нейтральных липидов в печени приведены в табл. 3. У животных контрольной группы половину нейтральных липидов составляли триацилглицерины. Уже к 3 ч после введения липида А количество этих липидов возрастало в 2,5 раза и составляло

Т а б л и ц а 1

Содержание липидов (в мг/г) в ткани печени мышей после введения липида А из брюшно-тифозного ЛПС

Фракция липидов	Контроль (n=7)	Время интоксикации, ч		
		3 (n=6)	6 (n=6)	24 (n=6)
Нейтральные липиды	40,9±2,2 —	76,6±4,7 $P < 0,001$	96,4±6,2 $P < 0,001$	122,2±8,4 $P < 0,001$
ФЛ	56,5±5,4 —	44,4±3,6 $P > 0,1$	87,3±5,6 $P < 0,01$	48,9±3,9 $P > 0,1$
Гликолипиды	22,5±1,2 —	21,5±2,7 $P > 0,1$	14,7±1,7 $P < 0,01$	26,7±3,0 $P > 0,1$
Общие липиды	119,9±8,9 —	142,7±9,4 $P > 0,1$	198,4±10,8 $P < 0,01$	197,8±10,7 $P < 0,01$

Т а б л и ц а 2

Содержание липидов (в мг/г) в ткани печени мышей после введения липида Б из ЛПС брюшно-тифозных бактерий

Фракция липидов	Контроль (n=7)	Время интоксикации, ч		
		3 (n=6)	6 (n=6)	24 (n=6)
Нейтральные липиды	40,9±2,2 —	84,1±7,2 $P < 0,002$	100,1±9,0 $P < 0,001$	90,9±8,8 $P < 0,002$
ФЛ	56,5±5,4 —	50,4±4,7 $P > 0,1$	88,8±7,4 $P < 0,02$	52,2±5,0 $P > 0,1$
Гликолипиды	22,5±1,2 —	14,5±0,72 $P < 0,001$	13,7±0,68 $P < 0,001$	39,3±2,6 $P < 0,01$
Общие липиды	119,9±8,9 —	149,0±10,1 $P < 0,1$	202,6±18,2 $P < 0,01$	182,4±16,1 $P < 0,05$

65% нейтральных липидов. В более поздние сроки уровень нейтральных жиров продолжал повышаться, хотя к концу суток среди них преобладали моно- и диацилглицерины. Концентрация НЭЖК под влиянием липида А вначале не изменялась, однако к 24 ч отмечено достоверное ($P < 0,02$) ее снижение. К 6 ч после введения липида А повышался уровень свободного и эстерифицированного ХС ($P < 0,002$ и $0,05$ соответственно). В более поздние сроки количество обеих фракций ХС не отличалось от исходного.

Липид Б так же, как и липид А, вызывал повышение количества триацилглицеринов в 3 и более раз, однако в этом случае появления моно- и диацилглицеринов отмечено не было. Из табл. 4 видно, как изменялось содержание НЭЖК под действием липида Б. Особенно значительным снижением уровня НЭЖК было к концу суток. Под влиянием липида Б существенно повышалось количество эфиров ХС, которое к 24 ч в 2 раза превышало исходное. Содержание свободного ХС возрастало к 3 ч ($P < 0,05$),

к 6 ч оно понижалось ($P < 0,001$) и к концу суток вновь возвращалось к первоначальному. Токсичность липида А для мышей значительно уступает токсичности целого ЛПС.

Как известно, LD₅₀ препаратов липида А из *S. minnesota* пяти различных штаммов колеблется от 1,7 до 4 мг на мышь [4]. В наших опытах использованы дозы липидных препаратов, которые в 10 и более раз были ниже LD₅₀. Инъекции этих препаратов не оказывали существенного влияния на поведение экспериментальных животных, однако вызывали значительные изменения активности некоторых ферментов печени [9]. Следует отметить определенную аналогию в изменениях содержания липидов в печени под действием обоих изученных липидных препаратов ЛПС, что связано, по видимому, с одинаковой их токсичностью для печени.

Т а б л и ц а 3

Содержание нейтральных липидов (в мг/г) в печени мышей после введения липида А из брюшно-тифозного ЛПС

Фракция нейтральных липидов	Контроль (n=7)	Время интоксикации, ч		
		3 (n=6)	6 (n=6)	24 (n=6)
Триацилглицерины	20,3±1,8 —	51,1±5,8 $P < 0,01$	66,8±7,2 $P < 0,001$	38,4±3,6 $P < 0,02$
Моно- и диацилглицерины	—	—	—	63,8±5,6
НЭЖК	6,0±0,5 —	5,5±0,6 $P > 0,1$	5,5±0,26 $P > 0,1$	3,1±0,23 $P < 0,02$
Эфиры ХС	6,7±0,7 —	8,2±0,8 $P > 0,1$	10,3±1,0 $P < 0,05$	7,0±0,32 $P > 0,1$
Свободный ХС	7,9±0,72 —	9,8±0,84 $P > 0,1$	13,8±1,2 $P < 0,002$	9,9±0,8 $P > 0,1$
Всего . . .	40,9±2,2 —	76,6±7,4 $P < 0,01$	96,4±8,2 $P < 0,001$	122,2±9,3 $P < 0,001$

Т а б л и ц а 4

Содержание нейтральных липидов (в мг/г) в печени мышей после введения липида Б из ЛПС брюшно-тифозных бактерий

Фракция нейтральных липидов	Контроль (n=7)	Время интоксикации, ч		
		3 (n=6)	6 (n=6)	24 (n=6)
Триацилглицерины	20,3±1,8 —	57,6±5,5 $P < 0,002$	74,5±7,3 $P < 0,001$	67,1±5,9 $P < 0,001$
Моно- и диацилглицерины	—	—	—	—
НЭЖК	6,0±0,5 —	3,5±0,2 $P < 0,01$	4,0±0,3 $P < 0,02$	2,4±0,28 $P < 0,001$
Эфиры ХС	6,7±0,7 —	12,3±0,9 $P < 0,01$	18,7±1,5 $P < 0,001$	13,0±1,2 $P < 0,01$
Свободный ХС	7,9±0,72 —	10,7±0,8 $P < 0,05$	2,9±0,25 $P < 0,001$	8,4±0,77 $P > 0,1$
Нейтральные липиды, всего	40,9±2,2 —	84,1±7,2 $P < 0,002$	100,1±9,0 $P < 0,001$	90,9±8,8 $P < 0,002$

Накопление липидов в печени животных обеих экспериментальных групп происходило за счет повышения количества триацилглицеринов. Аналогичными оказались и изменения со стороны содержания общих ФЛ и гликолипидов под действием обоих препаратов. Сходное влияние они оказывают на концентрацию НЭЖК, однако более выраженное и раннее снижение этой фракции липидов отмечено под действием липида Б. Липид Б вызывал более выраженное и устойчивое повышение уровня эфиров ХС по сравнению с липидом А.

Несколько различным оказалось действие липидов А и Б на концентрацию свободного ХС в печени. Если сопоставить полученные нами данные со сведениями о влиянии целого ЛПС на липидный состав печени [3], нетрудно установить определенную аналогию. По нашим данным, гепатотоксическое действие липидной части ЛПС, равно как и самого эндотоксина, проявлялось в накоплении нейтральных липидов и в первую очередь триацилглицериинов. К концу суток под влиянием ЛПС и липида А появлялись моно- и диацилглицерины. Существенным различием в действии ЛПС и его липидных компонентов было влияние на концентрацию НЭЖК. Если ЛПС вызывал значительное повышение НЭЖК, то липид А почти не изменял, а липид Б вызывал существенное понижение количества кислот. Что касается Фл, то общее содержание их под действием ЛПС не изменялось, тогда как липидные препараты вызывали временное повышение количества этих липидов к 6 ч после введения. Факт этот пока трудно объяснить. Содержание гликолипидов под действием ЛПС, липидов А и Б изменяется аналогично.

Полученные факты свидетельствуют о том, что ведущим токсическим компонентом ЛПС является его липидная часть. По-видимому, именно эта часть молекулы ЛПС несет ответственность за развитие токсического ожирения печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мужиченко А. В., Сгибнева О. В. — Сборник науч. работ Волгоград. мед. ин-та, 1973, т. 26, с. 393. — 2. Lipińska-Piotrowska I., Piątko T. — Pat. Pol., 1976, v. 27, p. 251—261. — 3. Мужиченко А. В., Никольская О. Н., Хардина Г. В. — Вопр. мед. химии, 1978, № 3, с. 334—338. — 4. Galanos Ch., Reitschel E. T., Luderitz O. et al. — Europ. J. Biochem., 1972, v. 31, p. 230—233. — 5—6. Rank W. R., DiPaulli R., Flugge-Rank U. — Europ. J. Immunol., 1972, v. 2, p. 517—522. — 7. Reitschel E. T. — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol., 1975, Bd 287, S. 73—84. — 8. Apte R. N., Galanos Ch., Pluznik D. H. — J. Cell. Physiol., 1976, v. 87, p. 71—78. — 9. Мужиченко А. В. — Вопр. мед. химии, 1975, № 5, с. 497.

Поступила 15/IV 1978 г.

HEPATOTOXICITY OF LIPID COMPONENTS FROM LIPOPOLYSACCHARIDES OF SALMONELLA TYPHI

A. V. Muzhichenko, O. N. Nikol'skaya, G. A. Khardina

Chair of Biochemistry, Problem Laboratory of the Chair of Hospital Therapy, Medical School, Volgograd

Distinct increase in amount of total lipids occurred in mice liver tissue after intraperitoneal administration of typhoid lipids A and B (the latter was nonhydrolytically isolated from typhoid lipopolysaccharides). The alteration referred primarily to neutral lipids, especially to triacyl glycerides, content of which exceeded 3- and more-fold the initial one to the end of a day. The similarity was observed in alteration of triacyl glycerides, phospho- and glycolipids in presence of both lipid preparations. These lipid components resembled intact lipopolysaccharide from typhoid bacteria in their effect on content of lipids in liver tissue. In treatment with these lipid preparations concentration of NEFA was either unaltered or distinctly decreased.

УДК 612.353

Г. В. Холмина, В. З. Горкин

ОБ ОКИСЛЕНИИ ЖИРНО-АРОМАТИЧЕСКИХ АЛЬДЕГИДОВ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Из экстракта печени крыс путем фракционирования сульфатом аммония в сочетании с градиентной сорбтивной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-25 (или молселекте ДЭАЭ-25), КМ-сефадексе С-25 и гель-хроматографией на сефадексе G-200 изолирована и очищена белковая фракция, не содержащая НАД·Н (или НАДФ·Н)-за-

висимых альдегидредуктаз, а также НАД (или НАДФ)-зависимых альдегиддегидрогеназ, но обладающая свойством катализировать окисление жирно-ароматических альдегидов. Исследования молекулярной массы и каталитических свойств полученной белковой фракции позволили идентифицировать ее с ферментом ксантиноксидазой (КФ 1. 2. 3 2.).

Согласно современным представлениям [1], для биологического действия жирно-ароматических аминов важное значение имеют биохимические превращения образующихся при окислительном дезаминировании аминов соединений, содержащих альдегидную группу. Среди ферментов, катализирующих различные биохимические превращения жирно-ароматических альдегидов в организме человека и животных, наибольшее значение в настоящее время придают НАД·Н (или НАДФ·Н)-зависимым альдегидредуктазам и алкогольдегидрогеназам тканей млекопитающих, катализирующим восстановление альдегидов до спиртов, а также НАД (или НАДФ)-зависимым альдегидоксидазам, катализирующим окисление альдегидов до соответствующих кислот [2]. Поскольку синтетические или образующиеся в результате ферментативного дезаминирования биогенных аминов жирно-ароматические альдегиды, соответствующие продуктам окисления важнейших нейромедиаторов или родственных им катехоламинов и индоламинов чрезвычайно лабильны, в большинстве работ в качестве субстрата используют 4-нитробензальдегид [1]. Инкубируя этот альдегид в пробах, содержащих избыток восстановленных пиридиновых нуклеотидов (НАД·Н или НАДФ·Н), измеряли величину активности альдегидредуктазы по снижению оптической плотности при 340 нм; об активности альдегидоксидазы судили по повышению оптической плотности при этой длине волны в ходе инкубации 4-нитробензальдегида с исследуемым биологическим материалом в присутствии избытка НАД или НАДФ.

В настоящей работе мы поставили перед собой задачу исследовать биохимические превращения жирно-ароматических альдегидов в тканях печени путем измерения снижения содержания 4-нитробензальдегида в пробах. Для этой цели мы использовали метод гидразонообразования, который был ранее применен в нашей лаборатории для колориметрического определения активности диаминооксидазы [3, 4]. Прямое определение снижения содержания 4-нитробензальдегида позволяет судить об активности альдегидредуктазы или альдегидоксидазы без добавления избытка восстановленных или окисленных пиридиновых нуклеотидов. В ходе исследования ферментативных превращений альдегидов в печени крыс нам удалось получить белковую фракцию, которая была свободна от НАД·Н (или НАДФ·Н)-зависимых альдегидредуктаз и НАД (или НАДФ)-зависимых альдегидоксидаз, но катализировала окисление жирно-ароматических альдегидов. Эта белковая фракция была идентифицирована с ксантиноксидазой.

М е т о д и к а

В работе были использованы белые беспородные крысы-самцы массой 150—180 г. Ткань печени гомогенизировали с 10-кратным объемом 0,25 М сахарозы в гомогенизаторе типа «Вейринг». Полученные гомогенаты подвергали дифференциальному центрифугированию при 4°C [5]. Ядра осаждали центрифугированием при 1500 г в течение 15 мин, митохондри — при 15 000 г в течение 30 мин. Полученную надосадочную жидкость использовали в качестве исходного тканевого экстракта, содержавшего ферментативную активность альдегидредуктазы и альдегидоксидазы. Для количественного определения 4-нитробензальдегида использовали методику, описанную ранее [3, 4]. Об окислении ксантина судили по повышению оптической плотности при 300 нм, что свидетельствовало об образовании мочевой кислоты [6]. Содержание белка в пробах измеряли колориметрическим методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

Сиворптивную хроматографию [7, 8] проводили в колонке К 50/60 или К 26/40 фирмы «Фармация» (Швеция).

Диск-электрофорез проводили в 7,5% полиакриламидном геле [9]. Для обнаружения белковых фракций электрофореграммы обрабатывали красителем кумасси голубой R-250 [10]. Для обнаружения белковых фракций, обладавших активностью альде-

гидоксидазы, электрофореграммы инкубировали в течение 30 мин при 37°C в пробах (общий объем 10 мл), содержащих: $4 \cdot 10^{-6}$ М 4-нитробензальдегид, $3,5 \cdot 10^{-4}$ М нитротетразолиевый синий, $3 \cdot 10^{-4}$ М феназинметасульфат, 0,1 М калий-фосфатный буфер рН 6,5 [11]. Появление окрашенных гранул формазана указывало положение на электрофореграммах белков, обладавших активностью альдегидоксидазы.

Тонкослойную хроматографию на покрытых силуфолом пластинках (фирма «Кавалир», ЧССР) проводили в смеси бензол — ацетон — ледяная уксусная кислота в соотношении 80 : 40 : 1, рекомендованной В. Ф. Позднеевым (Институт биологической и медицинской химии АМН СССР). Полярнографические изменения содержания кислорода в растворах (полярнограф ОН 102, Венгрия) проводили при помощи электрода Кларка с тефлоновой мембраной. Для рН-метрических измерений применяли потенциометр рН 262. Молекулярную массу белковых фракций определяли методом гель-фильтрации [12] на колонке К 25/60 (фирма «Фармация», Швеция), с сефадексом G-200. В работе были использованы сефадекс G-200, ДЭАЭ-сефадекс А-25, КМ-сефадекс С-25 (фирма «Фармация», Швеция), молселект ДЭАЭ-25 (фирма «Реанал», Венгрия), феназинметасульфат (фирма «Серва», ФРГ), нитротетразолиевый синий (фирма «Хемапол», ЧССР). Индолальдегид был синтезирован по описанному в литературе методу [13] в лаборатории органической химии Института биологической и медицинской химии АМН СССР К. М. Ермолаевым. Препарат аллопуринола был любезно предоставлен нам Л. С. Вартаняном (Институт химической физики АН СССР); 4-нитробензойная кислота, 4-нитробензиловый спирт и ксантин — химически чистые соединения отечественного производства.

Т а б л и ц а 1

Очистка белкового фактора, катализирующего снижение содержания 4-нитробензальдегида в отсутствие добавленных пиридиновых нуклеотидов

Этап очистки	Объем, мл	Содержание белка, мг/мл	Активность нмоль/мин/мл	Удельная активность нмоль/мин на 1 мг белка	Выход, %	Степень очистки
I. Исходный экстракт	400	11,7	3,9	0,33	100	1
II. Фракционирование сульфатом аммония	20	25,0	23,3	0,93	30	2,8
III. Градиентная сорбционная хроматография на анионите	140	0,4	2,86	7,15	25,6	21,6
IV. Сгущение	11	2,54	17,7	6,95	19	20,08
V. Градиентная сорбционная хроматография на катионите	45	0,10	2,82	28,8	7,25	84,5
VI. Гель-фильтрация	20	0,01	1,22	122,0	1,56	370,0

Очистка белкового фактора (табл. 1). I. Исходный экстракт получали при температуре 4°C, но перед проведением следующего этапа очистки его охлаждали до 0°C.

II. Фракционирование сульфатом аммония проводили при рН 6,5. Навеску кристаллического сульфата аммония добавляли медленно (при постоянном контроле величины рН и перемешивании магнитной мешалкой) до 0,45 насыщения. Через 30 мин образующийся осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 15 000 g, к надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония, как описано выше до 0,60 насыщения. Образующийся осадок собирали центрифугированием в течение 20 мин при 15 000 g и растворяли в минимальном объеме 0,025 М фосфатного буфера рН 6,5.

III. Градиентная сорбционная хроматография на анионите. Материал, полученный после фракционирования сульфатом аммония, подвергали дальнейшей очистке методом градиентной сорбционной хроматографии на колонке К 50/60 с анионитами ДЭАЭ-сефадексом А-25 или молселектом ДЭАЭ-25 (рис. 1).

Для перевода в хлоридную форму перед началом опыта (или при регенерации) сорбенты последовательно промывали 0,5 М NaOH и 0,5 М HCl, а затем доводили суспензию до рН 8,2 насыщенным водным раствором триса (в объеме). Осадок сорбентов суспендировали в 0,075 М KCl для перенесения в колонку. В колонке сорбенты промывали 2—3 колоночными объемами 0,02 М KCl в восходящем направлении при помощи перистальтического насоса. Введение в колонку линейного градиента концентрации KCl [7], исследуемого материала и элюирующих растворов также осуществляли в восходящем направлении при помощи перистальтического насоса со скоростью 3 мл/мин, собирая фракции объемом 12 мл. Во фракциях измеряли оптическую плотность при 280 нм, а также активность фактора. После сбора 30—35 фрак-

ций (суммарный объем которых соответствовал одному колоночному объему) удавалось в значительной мере отделить фактор от балластных белков (см. рис. 1). При этом альдегидредуктазы, которые катализировали снижение содержания 4-нитробензальдегида только в присутствии добавленных НАД·Н или НАДФ·Н, были обнаружены во фракциях № 10 и 11, соответствовавших первому белковому пику, и, таким образом, хорошо отделялись от исследуемого белкового фактора (см. рис. 1). Было

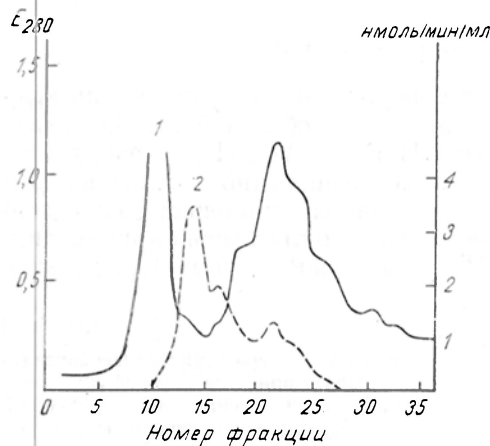


Рис. 1. Очистка фактора методом градиентной сиворптивной хроматографии на мол-селекте ДЭАЭ-25.

Объем колонки 600 мл, объем вводимого градиента концентрации КСl (0,02—0,075 М) 200 мл; объем исследуемой пробы 10 мл (250 мг белка). Элюция 100 мл 0,075 М КСl, а затем 1 М КСl до окончания сбора 35 фракций. Здесь и на рис. 2 и 3: 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — активность фактора.

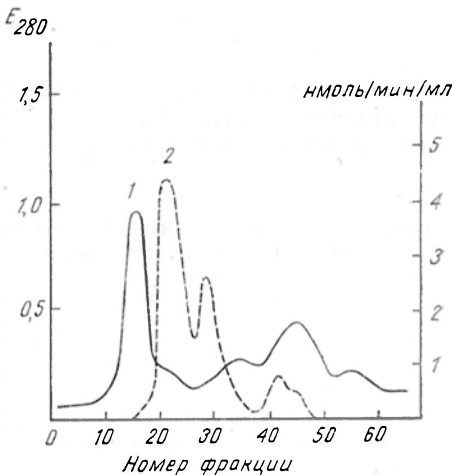


Рис. 2. Очистка фактора методом градиентной сиворптивной хроматографии на СМ-сефадексе С-25.

Объем колонки 200 мл, объем вводимого градиента концентрации КСl (0,02—0,3 М) 50 мл, объем исследуемой пробы 5 мл (20 мг белка). Элюция 30 мл 0,3 М КСl, а затем 1 М КСl до окончания сбора 70 фракций.

отмечено улучшение отделения исследуемого фактора от балластных белков в тех случаях, когда материал, полученный после II этапа очистки (табл. 1), освобождали от сульфата аммония пропуская через колонку с сефадексом G-25, уравновешенным 0,025 М калий-фосфатным буфером рН 6,5 или диализом в течение 18 ч против указанного буферного раствора.

IV. Сгущение активных фракций, собранных на предыдущем этапе очистки, проводили в ячейке «Амикон 202» с мембраной «Диафло РМ-30» при давлении 2 атм, создаваемом газообразным азотом.

V. Градиентную сиворптивную хроматографию на катионите проводили в колонке К 25/40 с СМ-сефадексом С-25 (рис. 2). Перед началом опыта (или при регенерации) сорбент последовательно промывали 0,5 М НСl и 0,5 М NaOH, а затем доводили суспензию до рН 5,0 насыщенным водным раствором лимонной кислоты (в объеме). Осадок сорбента суспендировали в 0,3 М КСl для перенесения в колонку. В колонке сорбент промывали 2—3 колоночными объемами 0,02 М КСl, после чего вводили линейный градиент концентрации КСl, исследуемый материал (сгущенную фракцию, полученную на предыдущем этапе очистки) и осуществляли элюцию, как описано выше, собирая фракции объемом 2,5 мл. Как видно на рис. 2, путем градиентной сиворптивной хроматографии предварительно очищенного материала удастся осуществить дальнейшее отделение балластных белков от белковых фракций, содержащих исследуемый фактор.

VI. Гель-фильтрация. Активные фракции, полученные на предыдущем этапе очистки, сгущали, как описано выше, и наносили на колонку К 26/60 с сефадексом

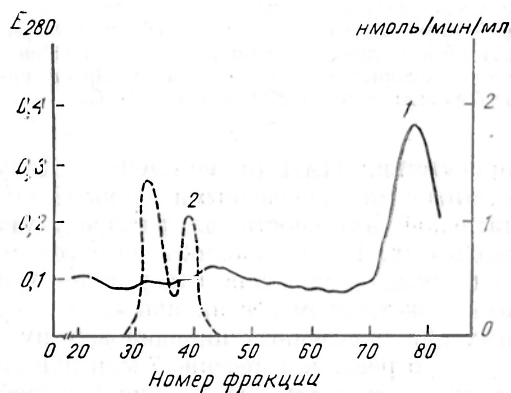


Рис. 3. Очистка фактора методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200.

Объем колонки 300 мл, объем исследуемой пробы 2 мл (3,6 мг белка). Условия элюции см. в тексте.

G-200, уравновешенным 0,025 М калий-фосфатным буфером pH 6,5. Элюцию проводили этим же буферным раствором, собирая фракции объемом 3,3 мл (рис. 3). В результате гель-фильтрации достигалась дополнительная очистка исследуемого фактора, хотя его выход не превышал 2%. Поэтому в основном при последующих исследованиях его свойств были использованы полученные на предыдущем этапе очистки активные фракции, превышавшие по удельной активности исходный экстракт более чем в 80 раз (при выходе 7—8%).

Результаты и обсуждение

Инкубация 4-нитробензальдегида в присутствии экстракта печени крысы сопровождалась снижением его содержания в пробах (табл. 2). Оно было более значительным в присутствии НАД·Н или НАДФ·Н в низких кон-

Таблица 2
Снижение содержания 4-нитробензальдегида при его инкубации в присутствии экстракта печени крысы

Добавка	Концентрация, М	Снижение содержания 4-нитробензальдегида, нмоль/мин/мг белка на 1
НАД·Н	$1,7 \cdot 10^{-5}$	0,3
НАДФ·Н	$1,7 \cdot 10^{-5}$	6,1
		4,3
Аскорбиновая кислота	$1,7 \cdot 10^{-5}$	0,3
Цистеин	$1,7 \cdot 10^{-5}$	0,3
Глутатион восстановленный	$1,7 \cdot 10^{-5}$	0,3
НАД	$1 \cdot 10^{-4}$	0,4
НАДФ	$1 \cdot 10^{-3}$	0,02

Примечание. Пробы (общий объем 3 мл) содержали по 0,5 мл (1,5 мг белка) экстракта печени крысы, 4-нитробензальдегид ($6,0 \cdot 10^{-5}$ М), 0,1 М калий-фосфатный буфер pH 6,5 и различные добавки, конечные концентрации которых указаны в табл. 2. Пробы инкубировали в течение 60 мин при 30°C.

присутствии НАД (но не НАДФ). Полученные результаты хорошо согласуются с многочисленными данными литературы [1, 2] о наличии ферментативной активности альдегидредуктазы и альдегидоксидазы в тканях животных. Представлялось интересным выяснить природу процесса, определяющего снижение содержания 4-нитробензальдегида при его инкубации с экстрактом печени крысы в отсутствие добавленных восстановленных или окисленных пиридиновых нуклеотидов.

Прогревание в течение 7 мин при 70°C экстракта печени крысы предотвращало снижение содержания 4-нитробензальдегида при его последующей инкубации в условиях, указанных в табл. 2. Эти данные свидетельствовали о термолабильности фактора, который обуславливал снижение содержания 4-нитробензальдегида при его инкубации с экстрактом печени крысы в отсутствие добавленных окисленных или восстановленных пиридиновых нуклеотидов. Оказалось, что этот фактор может быть осажден сульфатом аммония (в интервале концентраций 0,45—0,60 насыщения) и подвергнут дальнейшей очистке.

Исследование методом зонального диск-электрофореза [9] очищенной белковой фракции (50 мкг белка на электрофореграмму) экстракта печени крысы, катализировавшей снижение содержания 4-нитробензальдегида в от-

центрациях (но не аскорбиновой кислоты, цистеина, восстановленного глутатиона в эквивалентных концентрациях), а также в

Таблица 3
Снижение содержания 4-нитробензальдегида при его инкубации в присутствии очищенной белковой фракции из печени крысы

Добавки	Концентрация, М	Снижение содержания 4-нитробензальдегида, нмоль/мин на 1 мг белка
НАД·Н	$1,7 \cdot 10^{-5}$	28,2
НАДФ·Н	$1,7 \cdot 10^{-5}$	25,0
НАД	$5 \cdot 10^{-3}$	27,2
НАДФ	$1 \cdot 10^{-3}$	28,4
		27,5

Примечание. Состав проб и условия опытов те же, что в табл. 2, но пробы содержали вместо экстракта печени крысы по 0,5 мл (0,1 мг белка) очищенного фактора.

сутствие добавленных пиридиновых нуклеотидов, указывало на наличие одной, количественно преобладавшей белковой фракции, обладающей активностью альдегидоксидазы [11], а также одной дополнительной и 4—5 «минорных» белковых фракций, которые не катализировали окисление 4-нитробензальдегида с восстановлением нитросинего тетразолия.

Молекулярная масса очищенного фактора, по данным, полученным методом колоночной гель-фильтрации на сефадексе G-200 [12] с бычьим сывороточным альбумином (молекулярная масса мономера 67 000, димера 34 000), овальбумином (молекулярная масса 45 000) и каталазой (молекулярная масса 116 000) в качестве стандартных белков, составляла 50 000 дальтон.

Эти данные позволили предполагать, что изолированный и очищенный нами белковый фактор из печени крыс, катализировавший снижение содержания 4-нитробензальдегида в отсутствие добавленных пиридиновых нуклеотидов, неидентичен уже известным альдегидоксидазам или альдегидредуктазам [1, 2], а представляет собой ксантинооксидазу, свойство которой окислять альдегиды хорошо известно [14]. Последующие опыты были проведены для проверки этого предположения.

Для идентификации продуктов катализируемой исследуемым белковым фактором реакции снижения содержания 4-нитробензальдегида проводили длительную, в течение 3 ч, при 37°C инкубацию экспериментальных проб с их последующей фиксацией добавлением 1 М соляной кислоты, экстракцией продуктов реакции хлороформом и хроматографированием экстрактов на пластинках, покрытых силуфолом с использованием в качестве свидетелей препаратов 4-нитробензойной кислоты и 4-нитробензилового спирта. В ходе инкубации было отмечено образование 4-нитробензойной кислоты в результате окисления 4-нитробензальдегида за счет кислорода воды [14], на что указывали также результаты полярографических измерений содержания кислорода в экспериментальных пробах и результаты измерений рН.

Очищенные препараты белкового фактора были свободны от альдегидоксидаз и альдегидредуктаз: скорость снижения содержания 4-нитробензальдегида не изменялась при добавлении в пробы НАД (НАДФ) или НАД·Н (НАДФ·Н) (табл. 3). Эти ферментные препараты катализировали окисление ксантина до мочевой кислоты со скоростью, превышавшей при оптимальных условиях измерения скорость окисления 4-нитробензальдегида примерно в 2500 раз. В процессе очистки это соотношение не изменялось (см. табл. 1). Препараты исследуемого белкового фактора катализировали также окисление индолальдегида в отсутствие добавленных пиридиновых нуклеотидов с максимальной скоростью, не превышавшей 50% скорости окисления 4-нитробензальдегида этими же ферментными препаратами.

Наконец, ингибитор ксантинооксидазы аллопуринол [14] тормозил катализируемое полученными ферментами препаратами окисление 4-нитробензальдегида и ксантина при одних и тех же концентрациях (0,1 мМ — на 90%).

Полученные результаты позволяют идентифицировать очищенный белковый фактор экстракта печени крысы, катализирующий снижение содержания 4-нитробензальдегида в отсутствие добавленных пиридиновых нуклеотидов, с ферментом ксантинооксидазой.

Согласно современным представлениям [15], ксантинооксидаза в основном участвует в метаболизме пуринов, концентрации которых в тканях животных (в частности, в печени) и сродство к каталитическим центрам фермента значительно превышают соответствующие величины, полученные в опытах с жирно-ароматическими альдегидами. Однако можно предполагать, что катализируемое ксантинооксидазой окисление альдегидных групп некоторых фосфолипидов в артериях и миокарде имеет важное значение в развитии характерных для атеросклероза нарушений структуры тканей животных. Поэтому в биохимических превращениях жирно-ароматических альдегидов наряду с катализируемым альдегидредуктазами и алкогольде-

гидрогеназами восстановлением до спиртов важную роль играют реакции окисления альдегидов до соответствующих кислот, катализируемые альдегиддегидрогеназами, а также ксантинооксидазой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кривченкова Р. С. — Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1976, т. 21, с. 186—190. — 2. Табакофф В., Гелрке С. С. — In: Biochemical Pharmacology of Ethanol Ed. E. Majchrowicz. New York, 1975, p. 141—164. — 3. Турков М. И., Климова Г. И., Давыдова Г. А. et al. — *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 64, p. 177—185. — 4. Турков М. И., Климова Г. И., Давыдова Г. А. и др. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, т. 3, с. 5—9. — 5. Schneider W. S. — *J. biol. Chem.*, 1948, v. 176, p. 259—266. — 6. Greenlee L., Handler P. — *Ibid.*, 1964, v. 239, p. 1090—1095. — 7. Kirkegaard L. H. — *Biochemistry (Wash.)*, 1973, v. 12, p. 3627—3632. — 8. Пеккель В. А. — *Вопр. мед. химии*, 1977, т. 23, с. 407—412. — 9. Davis B. J. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, v. 121, p. 404—427. — 10. Maizel J. V. — *Science*, 1966, v. 151, p. 988—990. — 11. Blanco A., Zinkham W. H., Kupchuk L. — *J. exp. Zool.*, 1964, v. 156, p. 137—152. — 12. Andrews P. — *Biochem. J.*, 1964, v. 91, p. 222—233. — 13. Smith G. F. — *J. chem. Soc.*, 1954, p. 3842—3846. — 14. Bray R. C. — *Enzymes*, 1963, v. 7, p. 533. — 15. Ho C. Y., Clifford A. J. — *J. Nutr.*, 1976, v. 106, p. 1600—1609.

Поступила 15/V 1978 г.

ON THE OXIDATION OF FATTY-AROMATIC ALDEHYDES IN LIVER TISSUE

G. V. Kholmina, V. Z. Gorkin

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

A protein fraction, which did not contain NADP/or NADPH-dependent aldehyde reductases as well as NAD/or NADP-dependent aldehyde dehydrogenases, but which catalyzed oxidation of fatty-aromatic aldehydes, was isolated from extract of rat liver tissue using ammonium sulfate fractionation combined with gradient syvorptive chromatography on DEAE-Sephadex A-25/or Molselect DEAE-25/, CM-Sephadex C-25 and gel filtration on Sephadex G-200. Investigations of molecular weight and catalytic properties of the protein fraction obtained enabled to identify it with xanthine oxidase /EC 1.2.3.2/. Aldehyde dehydrogenases as well as xanthine oxidase are involved in oxidation of fatty-aromatic aldehydes to corresponding fatty acids, besides the reduction of the aldehydes to alcohols, catalyzed by aldehyde reductases and alcohol dehydrogenases.

УДК 612.822.1.015.1:577.152.143]-06:612.273-06:615.835.12

И. А. Горошинская

АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗ ТИПОВ А И Б В УСЛОВИЯХ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ

Научно-исследовательский биологический институт Ростовского-на-Дону университета

В условиях повышенного давления кислорода (4 ати, 1 ч) изменяется субстратная специфичность моноаминоксидазы (МАО) типа А в мозге и печени крыс. Параллельно снижению моноаминдезаминирующей активности фермент приобретает способность дезаминировать ряд веществ, в норме не являющихся субстратами МАО, в том числе аминоксахара. Активность МАО типа Б в мозге при гипероксии не изменяется. Предполагается важная роль изменений каталитических свойств МАО типа А в механизме развития кислородной интоксикации.

Широкое применение гипербарической оксигенации (ГБО) в технике и медицине обуславливает актуальность всестороннего изучения механизмов токсического действия на организм кислорода под повышенным давлением и поиска протекторов. При исследовании механизма кислородного поражения нами было установлено значительное снижение активности моноаминоксидазы (МАО) митохондрий мозга крыс при давлении кислорода от 2 до 6 ати. Снижение было тем больше, чем выше примененное давление кис-

лорода и продолжительнее его действие [1]. Уменьшение интенсивности дезаминирования моноаминов — норадреналина, серотонина и триптамина — сопровождалось существенным увеличением дезаминирования путресцина и АМФ и появлением способности дезаминировать глюкозамин. В печени также наблюдалось снижение моноаминоксидазной активности, хотя оно было выражено в меньшей степени, и значительно усиливалось дезаминирование путресцина [2]. Полученные данные позволили считать, что в условиях ГБО происходят качественные изменения каталитических свойств (трансформация) MAO, сходные с изменениями, обнаруженными ранее при лучевом поражении, гипervитаминозе D₂, злокачественных опухолях и ряде других патологий [3].

Как известно, в мозге и печени крыс и ряда других млекопитающих существуют по крайней мере две формы MAO (или два участка одного молекулярного комплекса): тип А (ингибируется хлоргилином, специфические субстраты норадреналин, серотонин и дофамин) и тип В (ингибируется депренилом, специфические субстраты β-фенилэтиламин и метилгистамин). Тирамин и триптамин дезаминируются обеими формами фермента [4—6].

Появление в условиях ГБО способности дезаминировать вещества, в норме не являющиеся субстратами фермента, обусловлено, по-видимому, изменением субстратной специфичности MAO типа А, поскольку хлоргилин, введенный животным перед сеансом гипероксии, предотвращал трансформацию MAO, а депренил не влиял на этот процесс [7].

Целью настоящей работы явилось более широкое изучение спектра действия трансформированной в условиях гипероксии MAO, а также исследование влияния кислорода под повышенным давлением на активность MAO типа В.

Методы исследования

Работа проведена на взрослых беспородных белых крысах-самцах массой 150—200 г. Повышенное давление кислорода создавали в специальной барокамере [8]. Митохондриальные фракции мозга и печени выделяли методами дифференциального центрифугирования [9—10]. Об активности MAO судили по освобождению аммиака в ходе 30-минутной инкубации суспензии митохондрий с одним из субстратов в насыщающей концентрации при 37,5°C и рН 7,4 [11]. Содержание аммиака определяли фенол-гипохлоридным методом [12] после изотермической отгонки [13]. При использовании в качестве субстрата *l*-нитрофенилэтиламина об активности MAO судили по интенсивности окраски, развивающейся в результате конденсации образовавшегося под действием фермента альдегида с избытком амина [11]. Для выражения активности фермента в наномолях аммиака строили кривую зависимости между интенсивностью окраски и количеством образующегося в пробах аммиака. Содержание белка определяли по методу Лоури [14]. При исследовании влияния хлоргилина и депренила на активность MAO суспензию митохондрий преинкубировали с одним из ингибиторов 15 мин при 20°C.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, при гипероксии параллельно снижению моноаминоксидазной активности MAO митохондрии мозга приобретают свойство дезаминировать наряду с путресцином, АМФ и глюкозаминем галактозамин и *N*-ацетилглюкозамин. В норме митохондрии мозга полностью лишены способности дезаминировать аминоксахара. Ферменты, дезаминирующие аминоксахара у интактных животных, локализованы в цитоплазме мозга. Интенсивность появляющегося в условиях ГБО дезаминирования галактозамина близка к интенсивности дезаминирования норадреналина у интактных животных, а дезаминирование *N*-ацетилглюкозамина даже превосходит контрольный уровень дезаминирования норадреналина.

Митохондрии печени при гипероксии также начинают дезаминировать глюкозамин. Возможность трансформированной MAO печени дезаминировать с высокой скоростью глюкозамин представляет особый интерес, поскольку в норме для печени характерен интенсивный синтез аминоксахаров,

Т а б л и ц а 1
Влияние гипероксии на активность MAO митохондрий мозга и печени крыс (в нмоль NH₃/мг белка /30 мин), M±m

Ткань	Условия опыта	Субстраты дезаминирования							
		норадреналин	серотонин	триптамин	путресцин	АМФ	глюкозамин	галактозамин	N-ацетил-глюкозамин
Мозг	Контроль	167±5 (27)	255±10 (18)	219±2 (35)	22±13 (11)	59±12 (11)	0 (11)	0 (7)	0 (5)
	ГБО (4 ати O ₂ , 1 час) p	22±12 (13)	47±16 (1)	57±13 (23)	111±14 (11)	208±23 (10)	122±22 (11)	138±17 (9)	184±27 (7)
Печень	Контроль	<0,001 180±7	<0,001 301±14	<0,001 248±5	<0,001 21±10	<0,001 9±4	<0,001 0	<0,001 —	<0,001 —
	ГБО (4 ати O ₂ , 1 час) P	<0,001 74±15 (14)	<0,01 178±30 (16)	<0,001 135±13 (27)	<0,01 143±26 (10)	>0,05 40±16 (12)	103±16 (8)	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках указано число опытов.

используемых в синтезе сывороточных белков, а глюкозаминдезаминарующая активность очень низка [15].

В мозге в условиях повышенного давления кислорода интенсивность дезаминирования триптамина снижается в меньшей степени, чем серотонина и норадреналина (соответственно на 74, 82 и 87%). В результате этого изменяется соотношение относительных скоростей дезаминирования моноаминов: триптамин становится лучшим субстратом MAO, чем серотонин (см. табл. 1). Серотонин и норадреналин являются субстратами только MAO-A, в то время как триптамин дезаминируется наряду с MAO-A и MAO-B. Следовательно, можно думать, что MAO-B более устойчива к действию ГБО по сравнению с MAO-A.

Для получения прямых данных о влиянии гипероксии на MAO-B необходимо было исследовать активность фермента с использованием субстрата, специфичного для MAO-B.

Удобным методом определения активности MAO является метод с использованием в качестве субстрата *n*-нитрофенилэтиламина. Поскольку в литературе имеются многочисленные данные об исследовании активности MAO этим методом без уточнения того, какая форма фермента при этом определяется, мы провели серию опытов с целью решения вопроса о специфичности *n*-нитрофенилэтиламина в качестве субстрата для MAO-A или MAO-B.

С этой целью исследовали *in vitro* влияние хлоргилина и депренила на интенсивность дезаминирования *n*-нитрофенилэтиламина митохондриями мозга (см. рисунок). Из рисунка следует, что депренил в концентрации выше 10⁻⁷ M практически полностью ингибирует активность фермента (на 92—97%). Дальнейшее увеличение концентрации депренила почти не сказывается на степени ингибирования, что говорит о полном насыщении активного центра фермента ингибитором. Хлоргилин в концентрации 10⁻⁸—10⁻⁶ M лишь незначительно

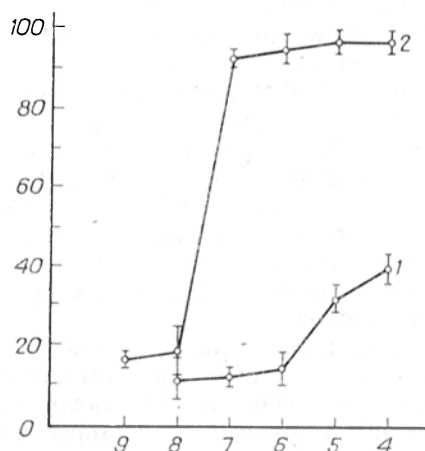
ингибирует активность MAO. И только при концентрации 10^{-5} — 10^{-4} M ингибирование составляет 30—40%. Таким образом, можно заключить, что *n*-нитрофенилэтиламин является субстратом MAO-B.

Активность MAO-B (субстрат *n*-нитрофенилэтиламин) исследовали при двух режимах гипероксии: 4 ати кислорода в течение 1 ч (предсудорожное состояние) и 6 ати кислорода до наступления судорог (табл. 2). Параллельно в опытах *in vitro* определяли влияние хлоргилина и депренила в концентрации 10^{-6} M на активность MAO митохондрий интактных и гипероксических животных. В указанной концентрации хлоргилин избирательно тормозит активность MAO-A, а депренил — MAO-B [16].

Как следует из табл. 2, активность MAO-B не изменяется ни в предсудорожной, ни в судорожной стадии кислородного отравления. Степень ингибирования активности фермента хлоргилином и депренилом в условиях ГБО не отличается от соответствующих величин у контрольных животных. Следовательно, трансформированная при гипероксии MAO-A не приобретает способности дезаминировать *n*-нитрофенилэтиламин, т. е. изменение субстратной специфичности MAO-A не распространяется на этот субстрат MAO-B.

Изменение каталитических свойств MAO-A, а не MAO-B обнаружено и при ряде других условий, способствующих трансформации фермента [17, 18].

Изменения активности и субстратной специфичности MAO типа A могут играть важную роль в механизме кислородной интоксикации. Сниже-



Ингибирование хлоргилином (1) и депренилом (2) дезаминирования *n*-нитрофенилэтиламина моноаминоксидазой митохондрий мозга.

Представлены средние данные из трех опытов.

По оси абсцисс — концентрация ингибитора ($-\lg M$); по оси ординат — ингибирование (%).

Таблица 2

Активность MAO с субстратом *n*-нитрофенилэтиламином в митохондриях мозга крыс при гипероксии ($M \pm m$)

Условия опыта	Активность MAO, нмоль NH_3 /мг белка/мин	Торможение (в %) активности MAO при добавлении к суспензии митохондрий ингибиторов	
		хлоргилина	депренила
Контроль	$3,99 \pm 0,17$ (11)	$18,1 \pm 1,7$ (12)	$91,6 \pm 1,6$ (12)
4 ати, 1 ч	$4,26 \pm 0,22$ (6)	$17,0 \pm 2,5$ (6)	$91,7 \pm 2,9$ (6)
<i>P</i>	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
6 ати, судороги	$3,97 \pm 0,26$ (7)	$16,9 \pm 3,7$ (8)	$91,8 \pm 1,7$ (8)
<i>P</i>	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

ние активности MAO ведет к нарушению инактивации медиаторов и изменению в результате этого нормального соотношения процессов возбуждения и торможения в центральной нервной системе и тем самым подготавливает условия для возникновения судорог. Полное ингибирование MAO в среднем мозге [19] — отделе, который играет ведущую роль в развитии судорожной активности при гипероксии, подчеркивает значение изменения свойств MAO в механизме кислородной интоксикации.

Изменение субстратной специфичности фермента может вызвать снижение содержания важных азотистых компонентов клетки и привести к образованию необычных промежуточных продуктов. Интересным представляется появление способности MAO типа А дезаминировать аминсахара: глюкозамин, галактозамин и N-ацетилглюкозамин, являющиеся структурными компонентами мембранных белков и ганглиозидов. С последними связывают образование нейронных ансамблей и другие специфические функции нервной ткани. При гипероксии резко усиливается дезаминирование глюкозамина гомогенатами мозга и снижается содержание его свободной формы в мозге [20]. Полученные данные позволяют считать, что одной из причин усиления дезаминирования глюкозамина при гипероксии является вовлечение MAO в метаболизм аминсахаров. Снижение содержания свободного глюкозамина может лимитировать образование всех других аминсахаров, предшественником которых он является, что должно сказаться на синтезе гликопротеидов и ганглиозидов. Таким образом, дезаминирование аминсахаров под влиянием модифицированной MAO является, по-видимому, одной из причин нарушения структуры и свойств мембран при кислородном поражении.

Подтверждением важной роли изменений каталитических свойств MAO в развитии кислородной интоксикации являются наши материалы, показавшие, что вещества, обладающие защитным эффектом при гипероксии (хлоргидин, мочевины), предотвращают изменение субстратной специфичности фермента [7, 21].

Значительные изменения активности и субстратной специфичности MAO типа А в условиях ГБО при сохранении активности MAO типа В характеризуют дискоординацию медиаторных моноаминергических систем в процессе развития кислородного поражения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Броновицкая З. Г., Горошинская И. А. — Укр. біохім. ж., 1976, т. 48, с. 295—299. — 2. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г. — *Вопр. мед. химии*, 1976, т. 22, с. 558—562. — 3. Горкин В. З. — *Молек. биол.*, 1976, т. 10, с. 717—736. — 4. Yang H. — Y., Neff N. H. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1974, v. 189, p. 733—740. — 5. Waldmeier P. C., Delini-Stula A., Maitre L. — *Arch. Pharmak. exp. Path.*, 1976, Bd 292, S. 9—14. — 6. Waldmeier P. C., Feldtrauer J. — J., Maitre L. — *J. Neurochem.*, 1977, v. 29, p. 785—790. — 7. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г., Горкин В. З. — *Commun. Psychopharmacol.*, 1977, v. 1, p. 39—47. — 8. Броновицкая З. Г., Гершенович З. С. — *Биохимия*, 1960, т. 25, с. 981—986. — 9. Brody T. M., Bain J. A. — *J. biol. Chem.*, 1952, v. 195, p. 685—689. — 10. Schneider W. C. — *Ibid.*, 1948, v. 176, p. 259—266. — 11. Горкин В. З., Веревкина И. В., Гриднева Л. И. и др. — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., 1968, т. 2, с. 155—177. — 12. Brown R., Duda C., Korkeas S. et al. — *Arch. Biochem.*, 1957, v. 66, p. 301—309. — 13. Seligson D., Seligson G. — *J. Lab. clin. Med.*, 1951, v. 38, p. 324—330. — 14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265—275. — 15. Lutwak-Mann C. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1941, v. 35, p. 610. — 16. Yang H-Y., Neff N. H. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1973, v. 187, p. 365—371. — 17. Шатемирова К. К., Веревкина И. В., Горкин В. З. — *Бюлл. exper. биол.*, 1977, т. 83, с. 669—670. — 18. Горкин В. З. — *Хим.-фарм. ж.*, 1977, т. 11, с. 6—13. — 19. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г. — *Вопр. мед. химии*, 1976, т. 22, с. 621—625. — 20. Броновицкая З. Г. — В кн.: *Всесоюзная конференция по нейробиологии*. 5-я. Тезисы докладов. Тбилиси, 1968, с. 119. — 21. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г. — *Изв. Сев.-Кав. научного центра высшей школы. Серия: Естеств. науки*, 1976, № 3, с. 89—90.

Поступила 17/V 1978 г.

ACTIVITY OF A AND B MONOAMINE OXIDASES IN HYPERBARIC OXYGENATION

I. A. Goroshinskaya

Biological Institute, State University, Rostov-on-Don

Substrate specificity of monoamine oxidase (MAO) of the A type from rat brain and liver tissues was altered after exposure of rats to an increased oxygen pressure /4 at₂, 1 hr/. Simultaneously with a decrease in monoamine deaminating activity the enzyme acquired an ability to deaminate several substances, which are not MAO substrates in normal state, in particular, aminosugars. Activity of MAO of the B type was not altered in brain under hyperoxia. Alterations in catalytic properties of MAO of the A type were apparently important in development of the oxygen intoxication.

УДК 616.314.17-008.1-092:577.152.193

Р. Д. Барабаш, Е. К. Гукевич, З. В. Березовская, Г. Н. Варава,
А. П. Левицкий, Ю. В. Дяченко

РОЛЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПАРОДОНТОЗА

Экспериментальный отдел и отделение пародонтологии Одесского научно-исследовательского института стоматологии Министерства здравоохранения УССР, Одесса

С целью изучения роли пероксидазы в патогенезе пародонтоза обследовано 132 больных воспалительно-дистрофической формой этого заболевания, а также проведены опыты на 8 видах лабораторных и домашних животных. У больных пародонтозом обнаружено достоверное увеличение активности пероксидазы в смешанной слюне и тканях десны, прямо коррелирующее с тяжестью заболевания. У кошек, отличающихся наиболее высоким содержанием этого фермента в тканях ротовой полости по сравнению с другими лабораторными животными, при воспалительно-дистрофическом поражении пародонта активность пероксидазы увеличивается только в десне и кости альвеолярного отростка. В длительном эксперименте на крысах не обнаружено повреждающего действия высоких концентраций экзогенной пероксидазы на ткани пародонта. Показано, что основными механизмами защитного действия этого фермента является бактериостатический эффект в отношении стрептококков в ротовой полости и торможение эмиграции лейкоцитов. Определение активности пероксидазы слюны рекомендуется в качестве эффективного способа диагностики тяжести пародонтоза и контроля результатов его лечения.

Важное биологическое значение пероксидазы (КФ 1.11.1.7 и КФ 1.11.1.8) определяется ее участием в окислении различных субстратов на мембранах митохондрий и микросом [1, 2]. С другой стороны, известна ее способность вызывать воспаление и деструкцию тканей млекопитающих [3, 4].

В то же время смешанная слюна млекопитающих в отличие от других тканей и жидкостей организма характеризуется высоким содержанием этого фермента. Основным продуцентом пероксидазы в этом случае являются слюнные железы и эмигрирующие лейкоциты [5]. На основании данных о бактериостатическом действии пероксидазы *in vitro* предполагается [6, 7], что она принимает участие в обеспечении антимикробной защиты тканей ротовой полости. Однако невыясненными остаются вопросы о соотношении защитных и повреждающих эффектов пероксидазы в конкретных условиях нормы и патологии тканей ротовой полости. Задачей настоящей работы явилось клиническое и экспериментальное исследование именно в этом аспекте механизмов участия пероксидазы в патогенезе пародонтоза.

Методика

С целью изучения зависимости между величиной секреции пероксидазы слюны и степенью поражения тканей пародонта обследовано 132 пациента с воспалительно-дистрофической формой пародонтоза и 42 практически здоровых человека. Группировку больных по степени тяжести пародонтоза проводили согласно величине индекса Рамфорта (ИР) [8] — начальная стадия — от 0,5 до 3,0; I степень — от 3,1 до 6,0; —II степень — от 6,1 до 9,0; II степень — от 9,1 до 12,0; II—III степень — от 12,1 до 15,0; III степень — от 15,1 до 21,0. Было также обследовано 75 больных пародонтозом, у которых из патологических зубодесневых карманов производили по-

сев гнойного содержимого на желточно-солевой агар и среду Гаро для выявления стафилококков и стрептококков. Количество микроорганизмов определяли путем прямого подсчета выросших колоний на чашках с селективными средами через 24—48 ч инкубации при 37°C.

Опыты по изучению влияния очищенной пероксидазы («Reopal», Венгрия) на эмиграцию лейкоцитов были проведены на группе добровольцев в возрасте от 25 до 40 лет, специально подобранных с таким расчетом, чтобы ИР колебался в очень узких пределах [8,3—9,5]. У всех пациентов натошак собирали смешанную слюну без стимуляции. С помощью центрифугирования при 2000 g в течение 15 мин при 4°C слюну разделяли на жидкую и осадочную фракции. Аналогичным образом обрабатывали гомогенаты тканей десны человека. Образцы десны получали у здоровых лиц при иссечении ее по показаниям к протезированию, а у лиц, больных пародонтозом, путем иссечения до начала лечения участка десны в области, предназначенной для электрогингивэктомии, а по ее окончании — в области, граничащей с послеоперационной раной. Экспериментальное исследование видового распределения пероксидазы в больших слюнных железах было проведено на 8 видах лабораторных и домашних животных. У 10 животных каждого вида выделяли околоушные, подчелюстные и большие подъязычные железы, ткань железы гомогенизировали из расчета 20 мг на 1 мл изотонического раствора хлористого натрия. В следующей серии опытов была использована 51 взрослая кошка весом 3,5—4,0 кг. Животные были разделены на группы по величине вычисленного пародонтального индекса (ПИ): 1-я группа (контроль) — 11 кошек с интактным пародонтом (ПИ 0—1,9); 2-я — 11 кошек с I степенью воспалительно-дистрофической формы пародонтоза (ПИ 2,0—3,9); 3-я — 19 кошек со II степенью той же формы пародонтоза (ПИ 4,0—6,9); 4-я — 7 кошек с III степенью той же формы пародонтоза (ПИ >7,0) и 5-я группа — 3 кошки с I и II степенями дистрофической формы пародонтоза (ПИ 2,0—6,9). В качестве ПИ использовали индекс Рамфьорда, модифицированный с учетом анатомических особенностей зубочелюстной системы кошек и включающий результаты рентгенологического исследования обнаружения корней зубов, воспаления десны, глубины зубодесневых карманов. Слюну у кошек собирали под наркозом (40 мг/кг этиминала натрия) с помощью стимуляции пилокарпином (1 мг/кг). После сбора слюны животных забивали, выделяли ткани десны и кость альвеолярного отростка нижней челюсти, из которых готовили гомогенаты обычным образом.

Возможность воспроизведения пародонтоза с помощью препарата очищенной пероксидазы исследовали на 29 крысах линии Вистар, равномерно распределенных в следующих сериях экспериментов: I — контроль (интактные крысы), II — крысы, получавшие питьевую воду с 8 Е/мл препарата пероксидазы, III — сиаладенэктомизированные крысы, IV — сиаладенэктомизированные крысы, получавшие питьевую воду с 8 Е/мл препарата пероксидазы. Удаление околоушных, подчелюстных и больших подъязычных желез производили у крыс в возрасте 1,5 мес. Начиная с этого возраста крысы, использованные в сериях эксперимента II и IV, непрерывно получали пероксидазу на протяжении 6 нед. Интенсивность возрастной атрофии альвеолярного отростка у крыс оценивали по проценту обнажения корней моляров [9]. Кроме того, гомогенаты десны и кости альвеолярного отростка этих животных использовали в биохимических исследованиях. В смешанной слюне и гомогенатах тканей десны человека и животных, кости альвеолярного отростка и больших слюнных желез животных определяли концентрацию растворимого белка [10], активность пероксидазы [11], кислотной и щелочной фосфатаз [12], катепсина при рН 3,5 и 5,5, казеинолитическую активность при рН 7,6, модифицированными нами методами [13, 14], активность лизоцима [15] и щелочной рибонуклеазы [16].

Процесс эмиграции лейкоцитов в ротовую полость человека оценивали дифференцированно по 3 показателям: эмиграции интегральной, эмиграции раздражения и эмиграции покоя. Определение первых 2 показателей проводили соответственно модифицированными методами М. А. Ясиновского [17] и Клинкамера [18], а 3-й показатель — разработанным нами способом. Ход определения этих показателей следующий. Готовили 8 химических стаканчиков, содержащих по 10 мл изотонического раствора хлористого натрия, а также 2 мерные пробирки для сбора промывных вод. Исследуемому предлагали произвести 4 последовательных полоскания полости рта (каждое по 50 полоскательных движений продолжительностью по 30 с). Промывные воды 4 полосканий отбрасывали. После 4-го полоскания следовал перерыв 5 мин. Затем производили 5-е полоскание (продолжительностью 30 с), промывные воды которого собирали в пробирку № 1. Без перерыва вслед за 5-м производили 6, 7 и 8-е полоскания по 30 с каждое. Промывные воды 8-го полоскания собирали в пробирку № 2. Каплю промывных вод 5-го и 8-го полосканий пипеткой помещали в счетную камеру Фукс — Розенталя с заранее притертым стеклом и подсчитывали под малым увеличением микроскопа (объектив 8X или 10X, окуляр 10X или 15X) число лейкоцитов. Количество лейкоцитов, эмигрировавших за 5,5 мин в 5-м смыве (по

М. А. Ясиновскому), определяли по формуле:
$$A = \frac{x \cdot 10\,000}{3,2}$$
, где x — число лейкоцитов во всей сетке, 10 000 — объем (в мм³) изотонического раствора NaCl, которым производили полоскание; 3,2 — объем камеры (в мм³). Количество лейкоцитов, эмигрировавших за 30 с в 8-м смыве (Б), определяли таким же образом. Дифференциаль-

ные показатели эмиграции лейкоцитов рассчитывали по формулам: эмиграция интегральная = $\frac{A}{5,5}$ лейкоцитов в 1 мин; эмиграция раздражения = $B \times 2$ лейкоцитов в 1 мин; эмиграция покоя = $\frac{A - B}{5}$ лейкоцитов в 1 мин.

При статистической обработке данных использовали критерий Стьюдента в модификации Е. В. Монцевичюте-Эрингене [19], парный критерий Вилкоксона [20]. Кроме того, показатели прямолинейной и параболической корреляции рассчитывали с помощью ЭЦВМ «Мир-1» [21].

Результаты и обсуждение

При обследовании пациентов с воспалительно-дистрофической формой пародонтоза различной степени тяжести было обнаружено, что относительная и удельная активности, а также продукция пероксидазы в жидкой части и в осадке смешанной слюны больных достоверно увеличивалась уже в начальной его фазе и достигала наибольшей активности при II—III степенях пародонтоза (табл. 1). Корреляционный анализ показал наличие прямой сильной зависимости между активностью пероксидазы смешанной слюны и степенью поражения тканей пародонта, что указывает на тесную

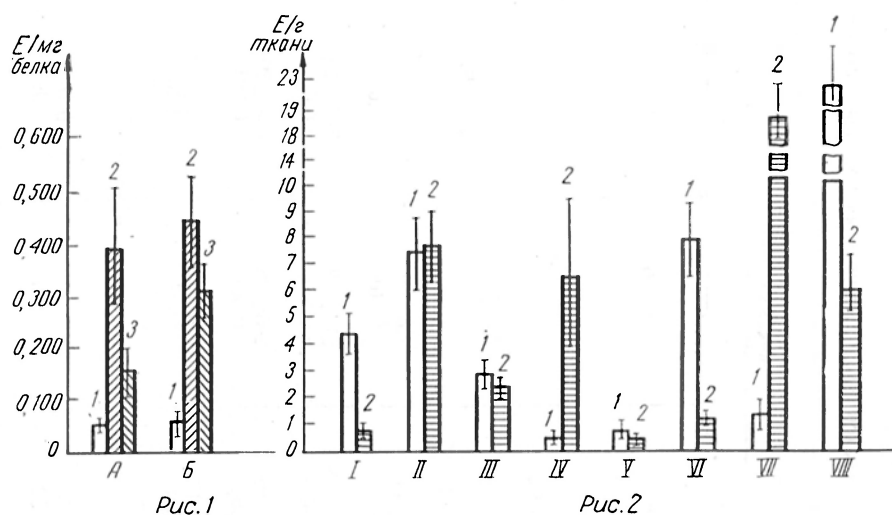


Рис. 1. Активность пероксидазы в десне (А) и смешанной слюне (Б) больных пародонтозом до и после лечения.

1 — контроль; 2 — до лечения; 3 — после лечения.

Рис. 2. Активность пероксидазы в слюнных железах животных.

I — мыши; II — золотистые хомяки; III — белые крысы; IV — морские свинки; V — бараны; VI — лошади; VII — крупный рогатый скот; VIII — кошки. 1 — околоушные железы; 2 — подчелюстные железы.

связь развития этого патологического процесса с активностью изучаемого фермента. Кроме того, близкие значения коэффициентов прямолинейной и параболической корреляции подчеркивают наличие прямой пропорциональной зависимости между тяжестью заболевания и активностью пероксидазы, что указывает на возможность использования показателей активности этого фермента в клинике с целью диагностики степени тяжести патологического процесса.

У больных пародонтозом резко (почти в 10 раз) увеличивалась также активность пероксидазы в тканях десны по сравнению с контрольными показателями (рис. 1). Можно полагать, что обнаруженное явление обусловлено накоплением в тканях пародонта миелопероксидазы, которой чрезвычайно богаты полиморфонуклеары [22, 23]. Последние, как известно, обильно инфильтрируют ткани десны на всех этапах развития пародонтоза [24].

Активность пероксидазы в слюне больных пародонтозом ($M \pm m$)

Группа обследованных	ИР	Смешанная слюна					
		жидкая часть			осадок		
		мЕ/мл	мЕ на 1 мг белка	мЕ/мин	мЕ/мл	мЕ на 1 мг белка	мЕ/мин
Контроль ИР 0—0,49	0,33±0,12	101±50	53±26	59±29	1170±480	40±16	87±41
Больные с воспали- тельно-дистрофической формой пародонтоза: начальная степень (ИР 0,5—3,0)	1,88±0,29 0,001	323±96 0,05	212±60 0,02	234±80 0,05	11 790±3190 0,002	580±180 0,003	538±150 0,001
I степень (ИР 3,1—6,0)	4,60±0,19 0,001	825±140 0,001	305±51 0,001	486±92 0,001	19 560±2820 0,001	873±145 0,001	1150±220 0,001
I—II степень (ИР 6,1—9,0)	7,48±0,17 0,001	797±116 0,001	434±63 0,001	520±77 0,001	16 560±2120 0,001	790±99 0,001	790±103 0,001
II степень (ИР 9,1—12,0)	10,43±0,21 0,001	790±138 0,001	313±49 0,001	569±102 0,001	16 470±2160 0,001	760±130 0,001	950±140 0,001
II—III степень (ИР 12,1—15,0)	13,11±0,25 0,001	707±165 0,001	265±35 0,001	433±79 0,001	24 190±6470 0,001	862±208 0,001	990±200 0,001
III степень (ИР 15,1—21,0)	16,86±0,25 0,001	820±120 0,001	330±58 0,001	570±100 0,001	25 570±6660 0,001	980±270 0,001	1440±310 0,001
Коэффициент корреляции: прямолинейной r_{xy} параболической η_{xy}		0,726 0,982	0,567 0,947	0,769 0,986	0,856 0,976	0,755 0,959	0,817 0,952

Группу из 59 пациентов с I—II степенью пародонтоза обследовали также повторно через 2 нед, по завершении курса лечения, включающего удаление зубных отложений, кюретаж зубодесневых карманов и наложение пародонтальных повязок, содержащих противовоспалительные средства. Установлено, что в результате лечения параллельно с улучшением клинического состояния тканей пародонта активность пероксидазы падает в 2,5 раза в десне и уменьшается на 30% в смешанной слюне. Возврат активности пероксидазы в результате проведенного лечения к контрольным показателям, во-первых, свидетельствует о непосредственном участии этого фермента в патогенезе заболевания и, во-вторых, позволяет использовать для контроля эффективности лечения.

Для выяснения вопроса о том, является ли обнаруженное увеличение активности пероксидазы при пародонтозе видовой особенностью человека или оно свойственно и другим видам млекопитающих, были предприняты опыты на животных. Прежде всего, с целью выбора вида животного, оптимального для таких исследований, было изучено распределение пероксидазы в слюнных железах различных лабораторных и домашних животных. При этом оказалось, что наиболее высокой активностью пероксидазы обладают околоушные железы кошек и подчелюстные железы крупного рогатого скота. Затем в порядке убывания по этому признаку следуют золотистые

Таблица 2
Активность пероксидазы в смешанной слюне, десне и кости альвеолярного отростка кошек при спонтанном воспалительно-дистрофическом поражении пародонта ($M \pm m$)

Серия	Смешанная слюна			Десна		Кость альвеолярного отростка	
	Е/мл	Е/мг белка	Е/час	МЕ/г ткани	МЕ/мг белка	МЕ/г ткани	МЕ/мг белка
Контроль	$0,356 \pm 0,099$	$0,105 \pm 0,027$	$32,6 \pm 10,4$	278 ± 30	$13,2 \pm 4,2$	234 ± 65	$15,0 \pm 2,4$
Пародонтоз I степень	$0,426 \pm 0,154$	$0,167 \pm 0,055$	$40,1 \pm 14,1$	332 ± 28	$14,0 \pm 6,0$	220 ± 69	$9,0 \pm 3,8$
P	0,63	0,33	0,69	0,21	0,92	0,92	0,21
II степень	$0,445 \pm 0,137$	$0,112 \pm 0,034$	$57,6 \pm 19,8$	853 ± 198	$56,0 \pm 16,0$	980 ± 230	$50,0 \pm 17,0$
P	0,62	0,92	0,28	0,007	0,04	0,006	0,06
III степень	$0,286 \pm 0,086$	$0,084 \pm 0,025$	$36,4 \pm 18,7$	1490 ± 303	$79,0 \pm 17,0$	1066 ± 232	$45,0 \pm 18,1$
P	0,62	0,56	0,84	0,001	0,002	0,008	0,14
дистрофическая форма	$1,25 \pm 0,66$	$0,311 \pm 0,121$	$141,0 \pm 80,2$	220 ± 34	$12,3 \pm 5,2$	202 ± 55	$14,3 \pm 1,9$
P	0,20	0,11	0,25	0,22	0,92	0,71	0,85
Коэффициенты корреляции: прямолинейной r _{xy}	-0,801	-0,561	0,129	0,988	0,960	0,880	0,768
параболической η _{xy}	0,999	0,830	0,994	0,999	0,997	0,995	0,976

хомяки, лошади, крысы, морские свинки, мыши и бараны (рис. 2). Поскольку спонтанное воспалительно-дистрофическое поражение пародонта у кошек, согласно общепринятому мнению [25, 26], подобно по большинству признаков пародонтозу человека, а также в связи с самой

Влияние экзогенной пероксидазы на активность ферментов

Серия опытов	Белок растворимый, мг/г ткани	Активность		
		фосфатазы, Е		казеинолитическая, МЕ
		pH 4,8	pH 10,5	pH 7,6
Контроль	54,13±6,052	0,0023±0,00050	0,012±0,0033	19,19±4,03
Питьевая вода				
добавка пероксидазы, 8 Е/мл	58,95±17,025	0,0041±0,0017	0,0055±0,0026	27,58±5,93
<i>P</i>	0,77	0,25	0,13	0,25
сиаладенэктомия:				
без добавок	42,46±10,01	0,0013±0,0004	0,0095±0,0026	42,38±11,03
<i>P</i>	0,34	0,16	0,56	0,07
добавка пероксидазы, 8 Е/мл	33,09±2,63	0,0033±0,0017	0,023±0,0026	15,78±2,72
<i>P</i>	0,015	0,70	0,03	0,50
<i>P</i> ₁	0,40	0,35	0,005	0,05

Примечание. Активность дана на 1 мг белка; показатель достоверности *P* бавок в питьевую воду.

Влияние экзогенной пероксидазы на активность ферментов кости

Серия опытов	Белок растворимый, мг на 1 г ткани	Активность		
		фосфатазы, Е		казеинолитическая, МЕ
		pH 4,8	pH 10,5	pH 7,6
Контроль	20,34±1,069	0,0033±0,0007	0,056±0,015	0,47±0,21
Питьевая вода				
добавка пероксидазы 8 Е/мл	15,92±1,15	0,0072±0,0016	0,085±0,008	2,19±0,50
<i>P</i>	0,016	0,016	0,11	0,008
сиаладенэктомия:				
без добавок	10,98±0,38	0,0059±0,0011	0,059±0,019	9,32±0,70
<i>P</i>	<0,001	0,03	0,92	<0,001
добавка пероксидазы, 8 Е/мл	14,53±0,37	0,0029±0,0002	0,030±0,011	10,75±0,82
<i>P</i>	0,001	0,77	0,20	<0,001
<i>P</i> ₁	<0,001	0,77	0,23	0,23

Примечание. Активность дана на 1 мг белка. Показатель достоверности *P* рас в питьевую воду.

высокой способностью слюнных желез кошек продуцировать пероксидазу, мы сочли их наиболее адекватным видом для модельных опытов.

У этих животных сопоставляли изучаемые параметры смешанной слюны, а также тканей десны и кости альвеолярного отростка нижней челюсти (табл. 2) с тяжестью патологического процесса в пародонте. Как показали результаты исследования смешанной слюны, при развитии воспалительно-дистрофического поражения пародонта у кошек активность пероксидазы в ней достоверно не изменялась в отличие от данных, полученных у челове-

ка. Иная картина наблюдалась в тканях десны и кости альвеолярного отростка. По мере развития патологического процесса в исследованных объектах увеличивалась активность пероксидазы, достигая максимальной величины при II и особенно при III степени поражения пародонта у кошек.

Т а б л и ц а 3

десны у интактных и сиаладенэктомированных крыс ($M \pm m$)

катепсины, мЕ		РНК-аза, Е	лизоцим, Е	пероксидаза, Е
рН 3,5	рН 5,5	рН 7,8	рН 6,2	рН 7,6
5,86±2,01	2,55±0,99	0,019±0,0025	0,26±0,076	0,021±0,014
14,69±8,53 0,34	0,69±0,37 0,10	0,026±0,0024 0,06	0,45±0,16 0,29	0,12±0,0070 0,007
31,19±13,38 0,08	10,55±3,91 0,07	0,028±0,004 0,07	0,28±0,12 0,92	0,085±0,068 0,40
11,93±1,04 0,03 0,20	0,48±0,28 0,08 0,03	0,048±0,0035 0,001 0,005	0,11±0,06 0,15 0,23	0,033±0,0040 0,44 0,44

рассчитан по отношению к контролю, а P_1 — к данным опытов с сиаладенэктомией без до-

Т а б л и ц а 4

альвеолярного отростка у интактных и сиаладенэктомированных крыс ($M \pm m$)

катепсины, мЕ		РНК-аза, Е	лизоцим, Е	пероксидаза, Е
рН 3,5	рН 5,5	рН 7,8	рН 6,2	рН 7,6
8,55±1,86	0,82±0,18	0,0085±0,0011	0,27±0,047	0,035±0,021
14,55±1,88 0,04	0,70±0,36 0,77	0,016±0,002 0,005	0,54±0,17 0,16	0,17±0,08 0,13
83,10±19,61 0,003	29,72±7,33 <0,001	0,032±0,0031 <0,001	0,58±0,11 0,02	0,12±0,063 0,18
2,56±0,65 0,02 0,004	3,66±0,31 <0,001 0,007	0,019±0,0017 <0,001 0,005	0,41±0,08 0,17 0,26	0,041±0,0070 0,77 0,26

считан по отношению к контролю, а P_1 — к данным опытов с сиаладенэктомией без добавок

Обнаруженное увеличение активности пероксидазы в тканях пародонта, по-видимому, обусловлено тем же механизмом инфильтрации фагоцитами, что и у человека.

В ходе анализа приведенных данных закономерно возникает принципиальный вопрос — играет ли увеличение активности пероксидазы защитную или повреждающую роль в развитии пародонтоза.

С целью получения ответа на этот вопрос были предприняты опыты по выяснению возможности воспроизведения пародонтоза в эксперименте на

интактных и сиаладенэктомированных крысах с помощью очищенного препарата пероксидазы. Опыты на сиаладенэктомированных крысах проводили для того, чтобы исключить параллельное влияние на результаты эксперимента пероксидазы, секретлируемой собственными слюнными железами животных.

Результаты исследований показали, что у крыс, содержащихся в условиях вивария, спонтанно развивается интенсивная атрофия кости альвеолярного отростка — уже в возрасте 3 мес обнажение корней моляров достигает 32,16%. Добавка интактным и сиаладенэктомированным крысам в питьевую воду препарата пероксидазы в концентрации, в 5 раз превышающей ее активность в слюне крыс, не оказывала ни предупреждающего, ни усугубляющего патологический процесс действия на ткани пародонта — показатели атрофии опытных и контрольных групп не отличались друг от друга

Таблица 5

Зависимость между активностью пероксидазы слюны и бактериальной обсемененностью зубодесневых карманов у больных пародонтозом

№ группы	Среднее число стрептококков в группе · 10 ³	Активность пероксидазы, Е/мл	№ группы	Среднее число стафилококков в группе · 10 ³	Активность пероксидазы, Е/мл
1	284	0,833	8	2	0,976
2	788	0,640	9	20	0,939
3	1388	0,895	10	38	0,540
4	3458	0,521	11	70	0,530
5	6638	0,735	12	143	0,606
6	13955	0,860	13	580	0,428
7	21000	0,500	14	6450	1,130
Коэффициенты корреляции:					
прямолинейной r_{xy}		-0,386			0,595
параболической η_{xy}		0,659			0,934

($P=0,10-0,27$). Следовательно, можно полагать, что повышение активности пероксидазы в слюне при пародонтозе не таит в себе потенциальной опасности деструкции тканей пародонта. Более того, о благоприятном влиянии пероксидазы на ткани пародонта свидетельствуют данные о резком снижении активности лизосомальных протеаз в десне и кости альвеолярного отростка крыс, получавших пероксидазу (табл. 3 и 4). Зависимость этого процесса от примененного воздействия подтверждается достоверным увеличением активности пероксидазы в тканях пародонта крыс с сохраненными слюнными железами, по-видимому, вследствие проникновения этого фермента из питьевой воды через барьеры слизистой оболочки полости рта. Отсутствие выраженного клинического эффекта в данном случае можно связать с наблюдаемым в большинстве случаев под влиянием перорального применения пероксидазы увеличением активности в тканях щелочной РНК-азы, которая, как известно, обладает способностью тормозить биосинтез белка [27].

На основе проведенных опытов можно сделать общий вывод о том, что повышение активности пероксидазы при пародонтозе у человека играет защитную роль.

Для выяснения механизмов этого защитного действия было проведено исследование на двух группах людей. В I серии экспериментов изучали корреляционную зависимость между обсемененностью патологических зубодесневых карманов стрептококками и стафилококками и активностью пероксидазы ротовой жидкости при пародонтозе. Как оказалось, преобладающим видом микроорганизмов, населяющим зубодесневые карманы, являются

стрептококки. Для проведения корреляционного анализа результаты индивидуальных опытов группировали по принципу возрастания количества высеваемых микроорганизмов (табл. 5). Как видно из таблицы, корреляционный анализ выявил обратную сильную зависимость между активностью пероксидазы и числом стрептококков. На этом основании, а также в связи с обнаружением прямой зависимости между активностью этого фермента и количеством стафилококков, можно полагать, что защитное значение увеличения активности пероксидазы слюны у больных пародонтозом связано в первую очередь с бактериостатическим эффектом в отношении стрептококков в ротовой полости. Последние, как известно, являются одним из основных видов микробной ассоциации, приводящей к образованию зубной бляшки и инициации иммунного воспаления пародонта [28, 29, 30]. Значение этой функции пероксидазы особенно возрастает при пародонтозе, поскольку при этом заболевании активность второго антимикробного фермента — лизоцима — достоверно уменьшается [31].

Т а б л и ц а 6

Влияние добавок эндогенной пероксидазы в полоскания на эмиграцию лейкоцитов у человека ($M \pm m$)

Эмиграция лейкоцитов	Контроль		Пероксидаза	
	абсолютная эмиграция, лейко/мин	относительная эмиграция, лейко/мин/нейтр. крови	абсолютная эмиграция, лейко/мин	относительная эмиграция, лейко/мин/нейтр. крови
Эмиграция раздражения	814 062	291,79	769 642	278,0
<i>p</i>	153 642	60,02	89 939	49,7
Интегральная эмиграция			>0,5	>0,05
<i>p</i>	207 658	90,74	157 336	55,80
Эмиграция покоя	56 774	28,20	27 902	9,10
<i>p</i>	146 953	53,21	<0,05	>0,05
<i>p</i>	138 566	21,54	96 132	33,50
			25 928	8,15
			>0,05	>0,05

Поскольку одним из основных механизмов патогенеза пародонтоза является увеличение эмиграции лейкоцитов и секреция ими лизосомальных ферментов [32, 33], в опытах на добровольцах было изучено влияние пероксидазы на этот процесс. Установлено (табл. 6), что полоскания полости рта раствором пероксидазы в концентрации, соответствующей таковой у больных пародонтозом, в целом подавляет процесс эмиграции лейкоцитов. Этот факт можно расценивать в качестве еще одного механизма защитного действия пероксидазы, так как существуют убедительные данные о невозможности вызвать яркий воспалительно-дистрофический процесс в тканях пародонта животных с лейкопенией и соответственно подавленной эмиграцией лейкоцитов в ротовую полость [34, 35].

Таким образом, проведенные исследования показали, что пероксидаза слюны и тканей пародонта является одним из ключевых ферментов патогенеза пародонтоза, выполняющих на всех этапах развития заболевания защитную, компенсаторную функцию.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Миронова Г. Д., Сирота Т. В., Сирота Н. П. и др. — Науч. докл. высш. школы. Биол. науки, 1976, № 11, с. 24—27. — 2. Buege J. A., Aust S. D. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 444, p. 192—201. — 3. Cotgran R. S., Karnovsky M. J., Joth A. — J. Histochem. Cytochem., 1968, v. 16, p. 382—383. — 4. Grey P., Sherwood M., Scheinberg M. et al. — J. reticuloendoth. Soc., 1976, v. 20, N 5, p. a3. — 5. Барабаш Р. Д., Левицкий А. П. — Вопр. мед. химии, 1978, № 3, с. 291—310. — 6. Wolf A. D., Turner N. C. — J. dent. Res., 1957, v. 36, p. 843—851. — 7. Kraus F. W.,

- Perry W. J., Nickerson J. F. — *Oral Surg.*, 1958, v. 11, p. 95. — 8. Ramfjord S. P. — *J. Periodont.*, 1959, v. 30, p. 51—59. — 9. Николаева А. В. Влияние некоторых нейротропных средств на состояние тканей пародонта при раздражении верхнего шейного симпатического узла. Автореф. дис. канд. Харьков, 1967. — 10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265—275. — 11. Сагаваса J., Мау D. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1964, v. 16, p. 528—534. — 12. Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M. J. — *J. biol. Chem.*, 1946, v. 164, p. 321—329. — 13. Левицкий А. П. Пищеварительные ферменты слюнных желез. Дис. докт. Одесса, 1973. — 14. Барабаш Р. Д., Левицкий А. П. — *Бюлл. exper. биол.*, 1973, № 8, с. 65—67. — 15. Gorin J., Wang S. F., Pararavliou L. — *Ann. Biochem.*, 1971, v. 39, p. 113—127. — 16. Левицкий А. П., Барабаш Р. Д., Коновец В. М. — *Ж. общ. биол.*, 1974, т. 35, № 1, с. 149—153. — 17. Ясиновский М. А. К физиологии, патологии и клинике слизистых оболочек. Харьков, 1931. — 18. Klinkhamer J., Limmerman S. — *J. dent. Res.*, 1969, v. 48, p. 709—715. — 19. Монцевичюте-Эрингене Е. В. — *Пат. физиол.*, 1964, № 4, с. 71—78. — 20. Гублер Е. В., Генкин. Применение критериев статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М., 1969. — 21. Сепетлиев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях. М., 1968, с. 232—252. — 22. Schroeder H., Page R. — *Experientia (Basel)*, 1972, v. 28, p. 1228—1230. — 23. Vaggiolini M. — *Enzyme*, 1972, v. 13, p. 132—150. — 24. Perissel V., Rarhanel L., Malet P. et al. — *Actualités odontostomat.*, 1974, v. 106, p. 351—360. — 25. Киселева Н. Ф. — *Стоматология*, 1973, № 5, с. 10—13. — 26. Ногодыски В., Думковска W., Стоковска W. et al. — *Czas. stomat.*, 1973, v. 26, p. 93—97. — 27. Alpers D. H., Isselbacher K. J. — *J. biol. Chem.*, 1967, v. 242, p. 5617—5722. — 28. Черткова Ф. А. — В кн.: Зубные инфекционные очаги в разрезе учения об очаговой инфекции. Одесса, 1934, с. 119—129. — 29. Dreier D. L. — *J. Am. dent. Ass.*, 1974, v. 88, p. 698—700. — 30. Demars C. — *Rev. Odontostomat. (Paris)*, 1977, v. 6, p. 189—196. — 31. Zachrisson B. U., Schultz-Handt S. D. — *Odont. T.*, 1968, v. 76, p. 179—192. — 32. Барабаш Р. Д., Левицкий А. П., Варава Г. Н. и др. — *Стоматология*, 1976, № 4, с. 22—27. — 33. Deporter D. A., Dieppe P. A., Glatt M. et al. — *J. Path.*, 1977, v. 121, p. 129—139. — 34. Attström R. — *J. Periodont. Res.*, 1971, Suppl. 8. — 35. Taichmann M. S., Freedman H. L., Uriuhara T. — *Arch. oral. Biol.*, 1966, v. 11, p. 1385—1392.

Поступила 23/V 1978 г.

THE ROLE OF PEROXIDASE IN PATHOGENESIS OF PERIODONTAL DISEASE

R. D. Barabash, E. K. Gukevich, Z. V. Berezovskaya, G. N. Varava, A. P. Levitski, Yu. V. Djachenko

Experimental Department and Department of Periodontology, Research Institute of Stomatology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Odessa

In order to study the role of peroxidase in pathogenesis of periodontitis clinical observations were carried out in 132 patients with inflammatory-dystrophic form of periodontal disease and eight species of laboratory and domestic animals were used in experiments. In the patients studied a distinct increase in peroxidase activity was observed in mixed saliva and in gum tissues, which correlated with the severity of the periodontal disease. Inflammatory-dystrophic impairment of cat periodontium was accompanied by an increase in the peroxidase activity only in gum and alveolar process tissues; cats are characterized by the highest content of peroxidase in oral tissues as compared with other laboratory animals. High amounts of exogenous peroxidase did not affect the periodontal tissues of rats during long-term experiments. The main protective effects of the enzyme were as follows: bacteriostatic influence on streptococci in oral cavity and inhibition of leukocyte emigration. Estimation of the peroxidase activity in saliva may be considered as a diagnostic test for periodontitis and may be used to monitor the course of treatment.

А. С. Кузнецов

КОМПЛЕКСЫ АПО-В СОДЕРЖАЩИХ ЛИПОПРОТЕИДОВ С ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНАМИ С ПЛОТНОСТЬЮ ВЫШЕ 1,063 г/мл В АОРТЕ ЧЕЛОВЕКА

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

В опытах in vitro установлено, что липопротеиды (ЛП) очень низкой и низкой плотности формируют комплексы с гликозаминогликанами (ГАГ) и часть таких комплексов имеет плотность выше 1,063 г/мл. Утяжеленные комплексообразованием с ГАГ апо-В, содержащие ЛП, также выявлены в экстракте интимы аорты человека. Содержание холестерина в составе комплексов, имеющих плотность выше 1,063 г/мл, выделенных из пораженных атеросклерозом участков аорты, больше, чем в комплексах, выделенных из непораженных участков. У кроликов с экспериментальным атеросклерозом включение ^{35}S в ГАГ комплекса с плотностью выше 1,063 г/мл по мере увеличения площади поражения аорты сначала возрастает, а затем снижается.

Для понимания патогенеза атеросклероза важное значение имеет изучение превращений липопротеидов (ЛП) сыворотки крови в стенке сосуда. Известно, что ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) и ЛП низкой плотности (ЛПНП) в отличие от ЛП высокой плотности (ЛПВП) образуют комплексы с гликозаминогликанами (ГАГ) — компонентами соединительнотканного матрикса сосудистой стенки [1, 2]. Показано также, что ЛПОНП и ЛПНП экстрагируются из стенки сосуда в виде комплексов с ГАГ [3—5]. Однако свойства комплексов ЛП — ГАГ охарактеризованы недостаточно полно. В нашей лаборатории получены данные о своеобразном перераспределении радиоактивности экстракта интимы — меди в сторону как меньшей, так и большей плотности после перфузии изолированной аорты кролика средой, содержащей меченые ЛП [6]. Высказано предположение, что эти изменения плотности ЛПОНП и ЛПНП являются результатом взаимодействия ЛП с ГАГ.

Целью настоящей работы явилась попытка выявить наличие ЛПНП в экстракте сосудистой стенки в плотности больше 1,063 г/мл в виде комплексов с ГАГ.

М е т о д ы

I серия опытов была выполнена на 9 кроликах-самцах, 3 из которых были контрольными, а 6 получали с овощами по 1 г холестерина на 1 кг массы ежедневно в течение 2—5 мес. После этого срока животным вводили внутривенно 5 мКи $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ в 2 мл 0,15 М NaCl и через 7 дней их забивали. Извлекали аорту, промывали ее физиологическим раствором, планиметрически определяли площадь атеросклеротического поражения [7]. Отделяли интиму — медию, получали экстракт [8], который подвергали ультрацентрифугированию в ступенчатом градиенте плотности KBr [9]. Пробирки разрезали таким образом, чтобы получить фракцию, соответствующую по плотности ЛПВП. Из данной фракции выделяли ^{35}S -ГАГ [4], которые растворяли в 0,5 мл воды, добавляли 10 мл сцинтиллятора тритозол [10], радиоактивность измеряли в сцинтилляционном счетчике «Unilux 11» («Nuclear Chicago», США). Данная серия экспериментов была дополнена одним опытом, в котором кролику с экспериментальной гиперхолестеринемией вводили внутривенно как $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, так и ^3H -холестерин в виде эмульсии с твином-20. Экстракт аорты и сыворотку крови животного подвергали ультрацентрифугированию в ступенчатом градиенте плотности. Пробирки разрезали на 10 равных частей и в каждой фракции определяли радиоактивность ^{35}S и ^3H .

II серия опытов выполнена in vitro. Из сыворотки крови кролика, получавшего холестерин, выделяли ЛПОНП и ЛПНП [11], метили их ^{125}I [12]. ЛП смешивали с ГАГ, выделенными из пораженной атеросклерозом аорты человека [13]. Соотношение ЛП : ГАГ во всех случаях было 5 : 1 (мг/мг). Концентрацию ЛП определяли турбидиметрическим методом [14]. Смесь ЛП—ГАГ оставляли на ночь при 4°C и затем подвергали ультрацентрифугированию в ступенчатом градиенте плотности KBr. Пробирки разрезали на 4 части. Первые 3 по плотности соответствовали ЛПОНП,

ЛПНП и ЛПВП окрашенной суданом сыворотки крови. Четвертая часть имела плотность больше 1,250 г/мл. Радиоактивность определяли в кювете, которая была заполнена сцинтиллятором, содержащим олово («Koch—Light Co», Англия). Фракцию с плотностью 1,063—1,250 г/мл диализовали против 0,025 М CaCl₂, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин. Определяли радиоактивность осадка и супернатанта. Хлористый кальций был использован для того, чтобы перевести комплексы ЛП—ГАГ из растворимых в нерастворимые [11].

В III серии опытов ЛПНП выделяли из сыворотки крови человека с помощью препаративного ультрацентрифугирования в диапазоне плотностей 1,019—1,063 г/мл [11]. Проводили диализ ЛП против 0,15 М NaBr в D₂O (плотность раствора 1,063 г/мл), непосредственно перед опытом добавляли гепарин («Reparal», Венгрия) или протеогликаны (ПГ), выделенные из интимы липидных бляшек аорты человека [15]. Соотношение ЛП и гепарина (ПГ) было 5 : 1 (мг ЛП : мг уроновых кислот). Уроновые кислоты определяли карбазоловым методом [16]. Аналитическое ультрацентрифугирование проводили в ультрацентрифуге «Beckman», модель E (США) при 52 000 об/мин и 26°C. Проведено 4 опыта с гепарином и 2 с ПГ; 4 опыта были контрольными, т. е. только с ЛП.

В IV серии опытов использовали аорты человека, полученные после вскрытия не позже чем через 24 ч после смерти. Отделяли интиму и измельченную ножницами ткань выдерживали ночь при 4°C в 0,15 М NaCl на 0,005 М ЭДТА-НСI буфере pH 7,4, содержащем 0,001 М ЭДТА и 0,02% Na₂S₂O₃ (5—7 мл раствора на 1 г сырой ткани). Экстракт доводили до плотности 1,063 г/мл с помощью 0,15 М NaCl на D₂O [4], подвергали ультрацентрифугированию в течение 24 ч (ротор 50 Ti, 42 000 об/мин, 18°C; ультрацентрифуга L2-65 B «Beckman»). Фракцию с плотностью больше 1,063 г/мл диализовали в течение ночи против 0,025 М CaCl₂. Нерастворимый комплекс ЛП—ГАГ отделяли с помощью центрифугирования, делипидировали смесью хлороформ : метанол (1 : 1) и использовали для выделения ГАГ [4], которые разделяли методом микрозонного электрофореза на ацетатцеллюлозе (прибор фирмы «Beckman», модель R-101, США) [4]. Стандартами служили коммерческие ГАГ («Sigma», США). Диск-электрофорез осаждаемой ионами Ca²⁺ фракции в полиакриламидном геле проводили по методу Е. Я. Маграчевой [17].

В опытах, включавших исследование 14 аорт, определяли общий холестерин [18] во фракциях с плотностью как больше, так и меньше 1,063 г/мл. В этих исследованиях экстракт аорты перед ультрацентрифугированием очищали от ЛПВН на ультрагеле АсА-34 (ЛКВ, Швеция). Для элюции использовался тот же раствор, что и для экстракции ЛП; колонка 2,6×40,0 см. Апо-В во фракции экстракта аорты с плотностью выше 1,063 г/мл идентифицировали с антителами против ЛПНП человека («Seikagaku Kogyo», Япония) несколькими методами: путем иммунодиффузии в агаре [19], реакции коагуляционной преципитации [20], аффинной хроматографии на ультрагеле АсА-34 с ковалентно связанными антителами [21]: колонка 2×6 см; объем геля 18 мл; 1 мл геля связывал 0,6 мг ЛПНП, выделенных из сыворотки крови человека.

Результаты и обсуждение

Радиоактивность ³⁵S-ГАГ во фракции, имеющей плотность больше 1,063 г/мл, сначала возрастает, а затем снижается при увеличении площади поражения аорты (рис. 1). Уменьшение включения метки от точки а

Таблица 1

Взаимодействие сывороточных ¹²⁵I ЛПНП и ¹²⁵I ЛПВП с аортальными ГАГ *in vitro*. Перераспределение метки в ступенчатом градиенте плотности KBr в результате комплексообразования

Условия опыта	Распределение метки в градиенте плотностей, %				Метка осаждаемая Ca ²⁺ из плотности 1,063—1,250, %
	d < 1,006	1,006—1,063	1,063—1,250	1,250	
ЛПНП	73,5	11,4	5,1	10,0	0
ЛПНП+ГАГ	59,5	31,0	9,3	0,2	86,4
ЛПВП	8,3	89,8	0,8	1,1	0
ЛПВП+ГАГ	12,9	85,2	2,2	0,6	54,8

до точки б описывается линейным уравнением регрессии $y = 862 - 9 \cdot x$, коэффициент корреляции равен $-0,98$, что свидетельствует о значительной связи между изучаемыми величинами.

Результаты опыта с применением двойной метки (рис. 2) указывают на то, что хотя в сыворотке крови данного животного радиоактивность ³H и

^{35}S в диапазоне плотности 1,063—1,250 г/мл очень низкая, в экстракте сосудистой стенки радиоактивность ^3H и ^{35}S в основном выявляется именно в указанном диапазоне плотности. Это дает основание заключить, что в плотности выше 1,063 г/мл присутствуют комплексы холестерина — ГАГ и, следовательно, ЛП — ГАГ, поскольку вне связи с белком холестерин нерастворим и экстрагироваться из аорты в условиях данных опытов не может.

Изучение взаимодействия ЛПОНП и ЛПНП с ГАГ аорты человека показало, что доля метки в плотности больше 1,063 г/мл выше, чем в контрольных ЛП (табл. 1). Поскольку плотность ГАГ превышает 1,250 г/мл [22], а плотность ЛПОНП и ЛПНП меньше 1,063 г/мл, можно предполо-

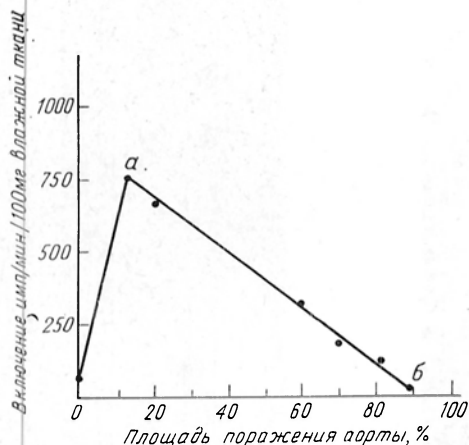


Рис. 1. Включение ^{35}S в ГАГ комплекса ЛП—ГАГ, изолированного из аорты кролика в диапазоне плотностей 1,063—1,250 г/мл.

а и б — см. текст.

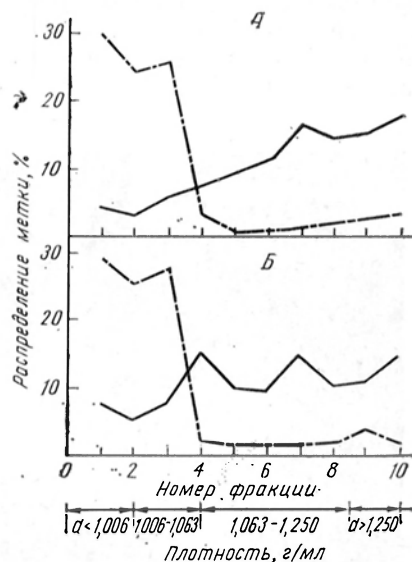


Рис. 2. Распределение радиоактивности (^{35}S и ^3H) экстракта аорты в градиенте плотности КВг.

А — радиоактивность ^{35}S ; Б — радиоактивность ^3H . Пунктирная линия — сыворотка крови, сплошная — экстракт аорты.

жить, что «утяжеление» ЛП связано с образованием комплекса ЛП—ГАГ. Появление метки, осаждаемой ионами Ca^{2+} , в плотности выше 1,063 г/мл в смеси ЛП — ГАГ и отсутствие ЛП, осаждаемых Ca^{2+} , в данной плотности контрольных проб также подтверждают предположение об образовании ЛП «утяжеленных» комплексобразованием с ГАГ.

С помощью аналитического ультрацентрифугирования установлено, что в присутствии гепарина и ПГ уменьшается скорость флотации ЛП, а также появляется седиментирующий компонент с константой седиментации 1,28 (рис. 3). Эти данные говорят об образовании комплекса ЛП — ГАГ, причем часть комплекса имеет плотность, превышающую 1,063 г/мл.

Во фракции экстракта аорты с плотностью выше 1,063 г/мл и осаждаемой Ca^{2+} были выявлены ГАГ: гиалуронат и хондроитинсульфат А и (или)

Таблица 2

Общий холестерин фракции экстракта интимы аорты человека (плотность больше 1,063 г/мл), полученной из 1 г сырой ткани

Исследуемый объект	n	Количество холестерина	
		мг	%
Непораженная аорта	10	0,157±0,042	7,98±2,21
Липидная бляшка	4	0,485±0,010	9,05±1,11
		P<0,001	

С (рис. 4). При электрофорезе в полиакриламидном геле данная фракция давала полосу пре- β -ЛП (рис. 5).

В изучаемой плотности иммунологически были идентифицированы ЛПОНП и ЛПНП, имеющие общий антиген-апо-В (положительная реакция колыцецентрипресипитации) и характерный для ЛПНП сыворотки крови профиль элюции с геля, к которому были пришиты антитела против этого класса ЛП (рис. 6). При иммунодиффузии в агаре преципитации получить не удалось. Это может быть связано с высокой молекулярной массой комплекса ЛП — ГАГ, так как размеры комплекса значительно больше размеров ЛП [23].

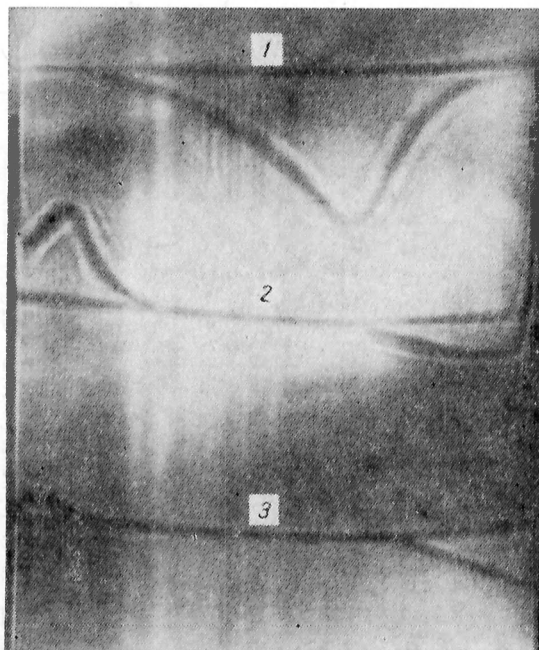


Рис. 3. Аналитическое ультрацентрифугирование ЛПНП и смесей ЛПНП — гепарин (ПГ). Концентрация ЛП во всех случаях 2,0 мг/мл. Фотографирование произведено через 27 мин после начала ультрацентрифугирования; 1 — ЛПНП; 2 — ЛПНП — гепарин; 3 — ЛПНП — ПГ.

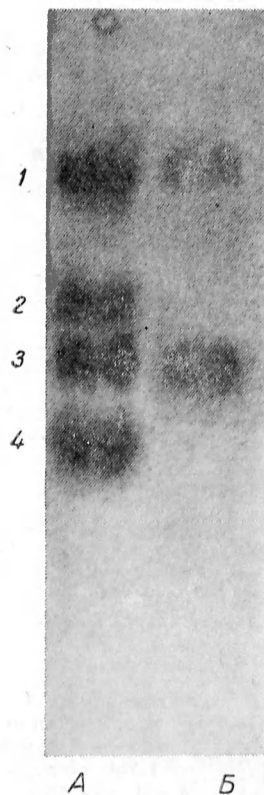


Рис. 4. Электрофорез ГАГ на ацетатцеллюлозе.

Пиридинформатный буфер, рН 3,2; окраска — 0,5% алциановый синий в смеси уксусная кислота — вода — метанол (10 : 40 : 50) в течение 30 мин. А — смесь коммерческих ГАГ; Б — экстракт сосудистой стенки (плотность выше 1,063 г/мл); 1 — гиалуронат; 2 — хондроитинсульфат В; 3 — хондроитинсульфаты А и С (движутся вместе); 4 — гепарин.

Результаты определения холестерина в экстракте аорты человека (плотность выше 1,063 г/мл) представлены в табл. 2, из которой видно, что в данной фракции находится 8—9% холестерина от общего холестерина экстракта (исключая ЛПВП). Полученные нами данные сходны с результатами других исследователей [4]. Абсолютное количество холестерина в ЛП, «утяжеленных» комплексобразованием с ГАГ, выше в пораженных сосудах, чем в неповрежденных (соответственно $0,157 \pm 0,042$ и $0,485 \pm 0,010$ мг, экстрагируемых из 1 г сырой ткани). По-видимому, формирование апо-В, содержащих ЛП, в сосудистой стенке с плотностью выше 1,063 г/мл связано с развитием атеросклеротических процессов.

Таким образом, результаты исследований указывают на присутствие ЛПНП в экстракте аорты, имеющих плотность больше 1,063 г/мл, что согласуется с имеющимися в литературе данными [5]. Следует отметить

что «утяжеленные» ЛПНП могут быть более сложными комплексами, включающими в свой состав, помимо ГАГ и (или) ПГ, структурные гликопротеиды (СГП), которые также связываются с ЛПНП [24]. Количество СГП возрастает в аорте с увеличением тяжести атеросклеротического процесса [25], а количество ГАГ сначала увеличивается и затем уменьшается [26]. Возможно, что на ранних стадиях развития атеросклероза форми-

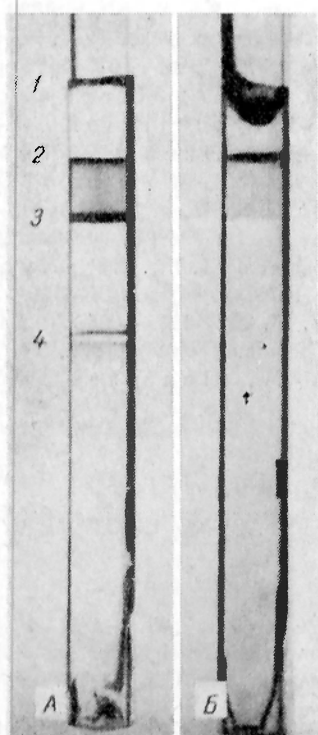


Рис. 5. Диск-электрофорез сыворотки крови и фракции экстракта сосудистой стенки (плотность выше 1,063 г/мл).

Окраска — судан черным. А — сыворотка крови; Б — фракция экстракта; 1 — старт; 2 — ЛПОНП (пре-β-ЛП); 3 — ЛПНП (β-ЛП); 4 — ЛПВП (α-ЛП).

необходимо учитывать постоянное наличие «утяжеленных» ЛПОНП и ЛПНП, чтобы иметь полное представление о судьбе ЛП.

Дальнейшее исследование состава, свойств и катаболизма упомянутых выше комплексов позволит выяснить их роль в механизме развития атеросклеротических поражений сосудов.

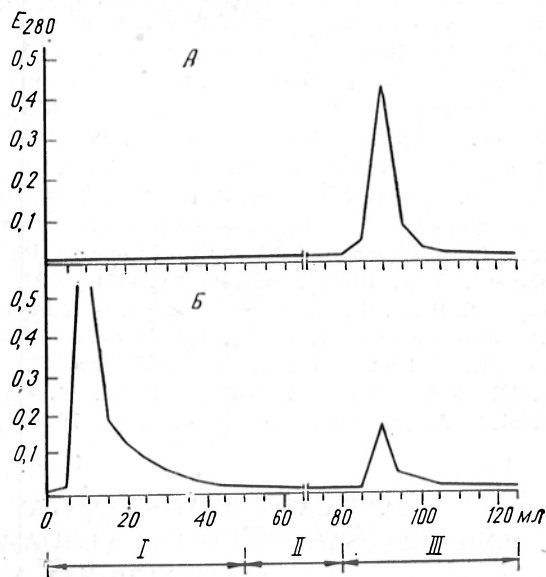


Рис. 6. Аффинная хроматография сывороточных ЛПНП и фракции экстракта сосудистой стенки (плотность выше 1,063 г/мл).

А — ЛПНП; Б — фракция экстракта. I — элюция 0,15 М NaCl в 0,005 М трис-НСl буфере рН 7,4, содержащем 0,001 М ЭДТА; II — элюция 0,5 М NaCl, III — элюция 8 М мочевиной.

рование «утяжеленных» ЛПНП обусловлено взаимодействием с ГАГ, а на поздних этапах в комплексе ЛПНП — ГАГ — СГП возрастает доля СГП и уменьшается количество ГАГ.

При изучении превращений апо-В, содержащих ЛП в стенке сосуда, видимо, необходимо учитывать постоянное наличие «утяжеленных» ЛПОНП и ЛПНП, чтобы иметь полное представление о судьбе ЛП.

Дальнейшее исследование состава, свойств и катаболизма упомянутых выше комплексов позволит выяснить их роль в механизме развития атеросклеротических поражений сосудов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bihari-Varga M. — Acta chim. Acad. Sci. hung., 1965, v. 45, p. 219—230.
2. Iverius P.-H. — J. biol. Chem., 1972, v. 247, p. 2607—2613.
3. Srinivasan S. R., Dolan P., Radhakrishnamurthy B. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1975, v. 338, p. 58—70.
4. Srinivasan S. R., Dolan P., Radhakrishnamurthy B. et al. — Atherosclerosis, 1972, v. 16, p. 95—104.
5. Hollander W. — Exp. molec. Path., 1976, v. 25, p. 106—120.
6. Попов А. В., Андреева Л. И., Кузнецов А. С. — В кн.: Научная конф. молодых медиков Грузии. Материалы. Тбилиси, 1975, с. 103.
7. Автандилов Г. Г. Классификация и планиметрическая оценка атеросклеротических поражений сосудов. Нальчик, 1960, с. 16.
8. Попов А. В., Кузнецов А. С., Андреева Л. И. — Вопр. мед. химии, 1975, № 6, с. 655—658.
9. По-

- пов А. В., Андреева Л. И., Кузнецов А. С. — Там же, № 4, с. 434—437. — 10. Fricke U. — *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 63, p. 555—558. — 11. Naveil R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. — *J. clin. Invest.*, 1955, v. 34, p. 1345. — 1352. — 12. Helmkamp R. W., Contreras M. A., Izzo M. J. — *Int. J. appl. Radiat.*, 1967, v. 18, p. 747—757. — 13. Schiller S., Slover G. A., Dorfman A. — *J. biol. Chem.*, 1961, v. 236, p. 983—987. — 14. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Баньковская Э. Б. — *Лабор. дело*, 1966, № 5, с. 276. — 15. Nassall V. C., Saidera S. W. — *J. biol. Chem.*, 1970, v. 245, p. 4920—4930. — 16. Шароев П. Н., Зворыгина Н. Г. — *Лабор. дело*, 1977, № 1, с. 53. — 17. Марачева Е. Я. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 6, с. 625—630. — 18. Okinobu Okale, Takeshi Katayama, Yasuhiro Kanemase. — *Acta med. Okayama*, 1974, v. 28, p. 403—410. — 19. Quchterlonу O. — *Acta path. microbiol. scand.*, 1953, v. 32, p. 321—327. — 20. Дэвени Т., Гергей Я. *Аминокислоты, пептиды и белки. М.*, 1976, с. 123. — 21. Weston P. D., Avramias S. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, v. 45, p. 1574—1580. — 22. Mashburn T. A., Hoffman Ph., Dar-San Hsu. — *Biochim. biophys. Acta*, 1974, v. 352, p. 366—374. — 23. Woodard J. F., Srinivasan S. B., Zimmy M. L. et al. — *Lab. Invest.*, 1976, v. 34, p. 516—521. — 24. Bowness J. M. — *Atherosclerosis*, 1977, v. 27, p. 221—224. — 25. Saito H., Ototani N., Yosizawa Z. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1975, v. 77, p. 931—938. — 26. Stevens R. L., Colombo M., Gonzales J. Y. et al. — *J. clin. Invest.*, 1976, v. 58, p. 470—481.

Поступила 23/V 1978 г.

COMPLEXES OF APO-B CONTAINING LIPOPROTEINS
AND GLYCOSAMINOGLYCANS WITH A DENSITY ABOVE 1.063 G/ML
FROM HUMAN AORTA

A. S. Kuznetsov

N. N. Anichkov Department of Lipid Biochemistry and Atherosclerosis, Institute of Experimental Medicine Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Interaction of lipoproteins of very low and low density with glycosaminoglycans was studied in vitro. Using analytical and preparative ultracentrifugation the complexes formed were shown to possess a density above 1.063 g/ml. Similar complexes were identified in extracts of human aorta. The formation of the complexes was stimulated in atherosclerotic impairments of aorta.

УДК 612.398.145.3

Е. Я. Стан, М. П. Черников

К ВОПРОСУ О ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
КАППА-КАЗЕИНОВОГО ГЛИКОМАКРОПЕПТИДА

Институт питания АМН СССР, Москва

Гельхроматографией на колонке сефадекса Г-25 сверхтонкого из препарата каппа-казеинового гликомакропептида выделен низкомолекулярный пептидный материал с молекулярной массой 2000—700, способность которого тормозить желудочную секрецию при внутривенном введении более сильно выражена по сравнению с исходным материалом.

Полученные данные позволяют предполагать, что ингибиторное действие гликомакропептида обусловлено не всей молекулой, а каким-то ее фрагментом.

Гликомакропептид представляет собой С-концевой фрагмент молекулы каппа-казеина, включающий 64 аминокислотных остатка [1]. Этот пептид отщепляется от молекулы каппа-казеина при репиновой коагуляции молока в результате разрыва пептидной связи между остатком фен 105 и мет

106 [2]. Он содержит около 30% углеводов, представленных галактозаминном, галактозой и N-ацетилнейраминозой кислот, которая занимает концевое положение в структуре углеводной части гликомакропептида [3]. Ранее установлено, что гликомакропептид при внутривенном введении тормозит желудочную секрецию [4]. Электрофоретическое и гель-хроматографическое изучение позволило обнаружить его гетерогенность [5].

Целью настоящей работы являлось изучение ингибиторной активности во фракциях гликомакропептида.

М е т о д и к а

Общий казеин получали из свежего обрат осажждением соляной кислотой в изоточке [6]. Каппа-казеин выделяли из общего казеина фракционированием в растворах мочевины при различных рН методом Зиттла [7]. Гликомакропептид получал методом, основанным на гидролизе каппа-казеина пепсином [8]. Полученный препарат гликомакропептида в количестве 100 мг в 2 мл 5 М раствора мочевины наносили на колонку сефадекса Г-25 сверхтонкого размером 1×75 см, уравновешенную 5М раствором мочевины, которую использовали в качестве дезагрегирующего агента. Внешний объем колонки определяли с помощью химотрипсиногена. Собирали фракции по 2 мл при скорости вытекания 5 мл/ч. За выходом материала с колонки невозможно было следить по оптической плотности при 280 нм из-за отсутствия в гликомакропептиде аминокислот, поглощающих при этой длине волны. Реакцию с нингидрином нельзя было применять из-за присутствия мочевины, поэтому концентрацию пептидного материала во фракциях элюата определяли по содержанию в них N-ацетилнейраминозой кислоты методом Уоррена [9].

Фракция I, выходящая в наружном объеме колонки, освобождалась от мочевины на колонке с биогелем Р-2 (1,3×40 см), фракция II, выходящая во внутреннем объеме колонки сефадекса Г-25 сверхтонкого — на колонке сефадекса Г-10 размером 1×70 см, уравновешенной дистиллированной водой.

Колонку калибровали инсулином с молекулярной массой 6000 и пентагастрином с молекулярной массой около 700. Каждое из веществ-свидетелей наносили на колонку в 5 М растворе мочевины. Выход этих веществ с колонки регистрировался спектрофотометрически при 280 нм.

Фракцию II наносили на колонку в объеме 6 мл. Выход пептидного материала регистрировали по реакции с нингидрином, выход мочевины — по реакции с диацетилмонооксимом [10]. После освобождения от мочевины фракции I и II лиофилизировали.

Опыты по определению способности полученных фракций и исходного препарата гликомакропептида тормозить желудочную секрецию проводили на 2 собаках с павловским изолированным желудочком. Животных брали в опыт через 18 ч после кормления при щелочной или нейтральной реакции слизи, выделяющейся из изолированного желудочка. Исходный препарат гликомакропептида и фракцию I в дозах 25 мг и фракцию II в дозе 1,5 мг вводили собакам внутривенно в 5 мл физиологического раствора за 1 ч до применения пищевого раздражителя (100 г сырого мяса). Доза препарата и латентный период его действия установлены ранее [11]. Через каждые 15 мин определяли количество выделенного желудочного сока, а также его рН, общую свободную и связанную кислоту титрационным методом и содержание общих протеиназ методом Ансона в модификации М. П. Черникова [12].

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

Выделенный препарат гликомакропептида (исходный) при хроматографировании на колонке с сефадексом Г-25 сверхтонким разделился на 2 фракции (рис. 1). Фракция I, выходящая во внешнем объеме колонки, представляла собой, по-видимому, недеградированный гликомакропептид и составляла 96% исходного препарата. Фракция II выходила одним пиком во внутреннем объеме колонки и включала низкомолекулярный пептидный материал; эта фракция составляла 4% от исходного препарата.

Каждая из полученных фракций освобождалась от мочевины. Полное отделение фракции I от мочевины было достигнуто на колонке с биогелем Р-2, фракция II на этой колонке выходила во внутреннем объеме вместе с мочевиной, поэтому освобождение ее от мочевины проводили на колонке сефадекса Г-10, предварительно прокалброванной (рис. 2).

Как видно из рис. 2, инсулин выходил в наружном объеме колонки, пентагастрин — во внутреннем. При объеме пробы, равном 6 мл (10% от

объема колонки), наблюдалось полное отделение инсулина от мочевины. Пик мочевины на рис. 2 представлен схематично ввиду очень высокой ее концентрации. Пик пентагастрина значительно, но не полностью, совпадал с пиком мочевины. Фракция II выходила в наружном объеме колонки, что обеспечивало хорошее ее отделение от мочевины. Во внутреннем объеме колонки в пробирках № 20, 21 и 22, которые еще свободны от мочевины, пептидный материал не обнаруживался, что позволило предполагать, что

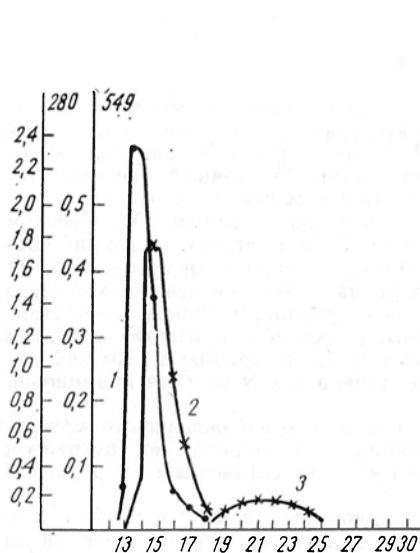


Рис. 1. Хроматография гликомакропептида на колонке сефадекса Г-25 сверхтонкого размером 1×75 см в 5М мочеvine рН 5,2.

По оси абсцисс — фракции; по оси ординат — длина волны (в нм). 1 — химотрипсиноген; 2 — фракция I; 3 — фракция II.

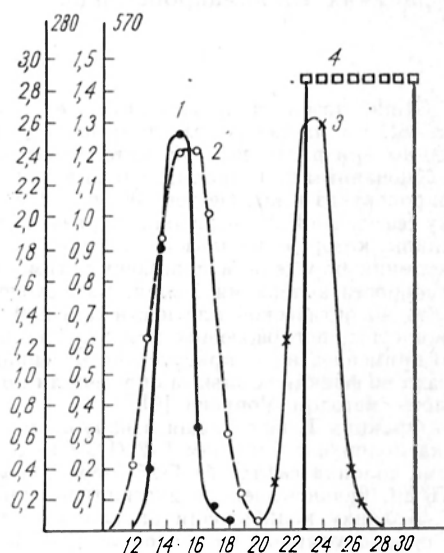


Рис. 2. Освобождение от мочевины фракции II на колонке сефадекса Г-10 размером 1×70 см.

По оси абсцисс — фракции; по оси ординат — длина волны (в нм). 1 — инсулин; 2 — фракция II; 3 — пентагастрин; 4 — мочевина.

фракция II не содержит пептидов с молекулярной массой ниже 700. Тот факт, что фракция II на колонке с биогелем Р-2 выходила во внутреннем объеме колонки, а на колонке с сефадексом Г-10 — в наружном, позволил считать, что она имеет молекулярную массу в пределах 2000—700.

Данные по ингибиторному действию фракций на желудочную секрецию подопытных животных хорошо совпадают между собой. Результаты одного из опытов представлены на рис. 3.

Внутривенное введение 25 мг исходного гликомакропептида обуславливало значительное торможение желудочной секреции в 1-й час опыта и к почти полному прекращению сокоотделения в течение 2-го и 3-го часов; лишь на 4-м часу действие препарата прекращалось.

В период максимального снижения желудочной секреции концентрация протеиназ в соке незначительно возрастала, а общая кислотность сока и содержание в нем свободной соляной кислоты снижались в 2—3 раза. Введение 25 мг фракции I, которая представляет собой гликомакропептид, освобожденный от низкомолекулярного материала, оказывало значительно более слабое ингибирующее действие на желудочную секрецию, чем исходный препарат. Торможение секреции при этом сохранялось в течение 3 ч, но оно было значительно слабее выражено.

Фракция II уже в дозе 1,5 мг оказывала отчетливое тормозящее действие на желудочную секрецию, в то время как фракция I в этой дозе была неэффективна. Таким образом, ингибиторная активность фракции II значительно выше, чем у фракции I.

Полученные данные позволяют предполагать, что ингибиторная активность гликомакропептида может быть обусловлена присутствием в препарате низкомолекулярного гликопептида или гликопептидов. Этот гликопептид, по-видимому, может образовываться из гликомакропептида в результате его частичного протеолиза в процессе выделения из каппа-казеина под воздействием пепсина.

Сохранение у высокомолекулярной фракции некоторой способности тормозить желудочную секрецию может быть обусловлено наличием у нее физиологической активности, которая слабее выражена, чем у низкомолекулярных фрагментов.

В тонкой регуляции функций желудочно-кишечного тракта участвует система интестинальных гормонов или гормоноподобных веществ пептидной природы, которые вырабатываются эндокринными клетками слизистой оболочки желудка и кишечника.

Ранее установлено, что гликомакропептид способен тормозить секрецию, стимулированную аналогом гастрина, т. е. он обладает антигастринной активностью [11].

По действию гликомакропептид сходен с гормоноподобным интестинальным полипептидом, недавно выделенным из слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки и названным энтерогастроном или желудочным ингибиторным полипептидом [13].

В последнее время стало очевидным, что многие интестинальные пептидные гормоны встречаются более чем в одной молекулярной форме, т. е. являются гетерогенными. Так, обнаружено несколько форм гастрина с различной молекулярной массой [14, 15].

Большинство кишечных гормонов осуществляет свое действие за счет небольших участков пептидной цепи, хотя при этом сами молекулы гормонов могут быть достаточно крупными. Так, физиологическое действие всех форм гастрина может быть обусловлено С-концевым фрагментом из 4 аминокислотных остатков, а для имитации действия холецистокинина необходимо наличие только 6—8 С-концевых аминокислотных остатков [16].

Имеются данные о том, что высокомолекулярные формы гастрина, которые преобладают в сыворотке крови, являются физиологически неактивными, и наоборот, малые фрагменты молекулы, например С-концевой пентапептид, значительно активнее целой молекулы гастрина [17].

По аналогии с физиологически активными интестинальными пептидами можно полагать, что и физиологическая активность казеинового гликомакропептида может быть обусловлена не всей молекулой в целом, а лишь каким-то ее фрагментом, который, по-видимому, оказывает более выраженное действие на желудочную секрецию.

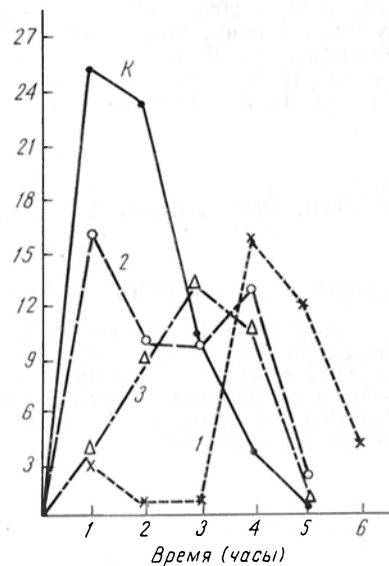


Рис. 3. Действие исходного гликомакропептида, фракций I и II на объем желудочной секреции.

По оси абсцисс — время (в ч); по оси ординат — секреция желудочного сока (в мл); К — контроль; 1 — исходный гликомакропептид; 2 — фракция I; 3 — фракция II.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mercier J. C., Ugo J., Ribadeau-Dumas B. et al. — Eur. J. Biochem., 1972, v. 27, p. 535. — 2. Jolles J., Alais C., Jolles P. — Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 168, p. 591. — 3. Tran V. D., Baker B. E. — J. Dairy Sci., 1970, v. 53, p. 1009. — 4. Черников М. П., Николь-

ская Г. В., Стан Е. Я. и др. — *Вопр. питания*, 1974, № 21, с. 21. — 5. Стан Е. Я., Черников М. П. — *Вопр. мед. химии*, 1974, № 20, с. 644—6. Hipp N., Groves M., Custer J. et al. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, v. 72, p. 4028. — 7. Zittle C. A., Custer J. H. — *J. Dairy Sci.*, 1963, v. 46, p. 1183. — 8. Варсанович Е. А., Никольская Г. В., Черников М. П. — *Вопр. питания*, 1974, № 1, с. 31—35. — 9. Waggen L. — *J. Biol. Chem.*, 1959, v. 234, p. 1971. — 10. Grosker C. L. — *Amer. J. Med., Technol.*, 1967, v. 33, p. 361. — 11. Василевская Л. С., Стан Е. Я., Черников М. П. и др. — *Вопр. питания*, 1977, № 4, с. 21. — 12. Черников М. П. — В кн.: *Биохимические методы исследования в клинике*. Под ред. А. А. Покровского. М., 1969, с. 197. — 13. Brown J. C., Mutt V., Pederson R. A. — *J. Physiol.*, 1970, v. 209, p. 57. — 14. Jalow R. S., Bergson S. A. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1972, v. 48, p. 391. — 15. Rehfeld I. F. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, v. 285, p. 364. — 16. Уголев А. М., Ефимова Н. В., Скворцова Н. Б. — *Успехи физиол. наук*, 1976, т. 7, с. 6. — 17. Morley J. S., Tracasy H. J., Gregor R. A. — *Nature*, 1965, v. 207, p. 1356.

Поступила 29/V 1978 г.

ON THE PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF K-CASEIN GLYCOMACROPEPTIDE

E. Ya. Stan, M. P. Chernikov

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

Low molecular peptide fragment /molecular weight 700-2,000/ was isolated from the preparation of k-caseine glycomacropeptide using gel chromatography on Sephadex G-25 superfine. After intravenous administration the peptide inhibited gastric secretion more distinctly as compared with the initial preparation. The data obtained suggest that the inhibitory effect of glycomacropeptide was caused by fragment but not by the whole molecule.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.398.145.1-087.4

М. М. Киреев, В. Д. Конвай

ПОЛУМИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОТОЭКСТРАГИРУЕМЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ОРГАНАХ МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Омского медицинского института
им. М. И. Калинина

Описан полумикрометод количественного определения кислотоэкстрагируемых нуклеотидов в органах мелких лабораторных животных, примененный для исследования нуклеотидного фонда мозга крыс. В основу методики положена хроматография нуклеотидов на колонке с дауэкс 1×8 с использованием градиента сложного профиля.

Исследование содержания кислоторастворимых нуклеотидов — адениловых, гуаниловых, уридилловых моно-, ди- и трифосфатов, инозин- и цитидинмонофосфатов, НАД, нуклеозидов и азотистых оснований — в тканях мелких животных затруднительно, поскольку для определения этих веществ методом ионообменной хроматографии [1, 2] требуется большое количество [20—50 г] материала. Методы бумажной и тонкослойной хро-

матографии [3, 4] полуколичественны, а ферментные требуют наличия дефицитных реактивов [5].

Мы предлагаем количественный способ определения указанных выше веществ в 1 г биологического материала, в основу которого положен метод хроматографии нуклеотидов на колонке с анионообменником дауэкс 1×8 [1, 2]. Нами уменьшены размеры колонки, скорость прохождения через нее элюэнта, объем отбираемых фракций, изменен способ создания градиента. Это позволило уменьшить количество исследуемой ткани в 10 раз и более. Для более четкого разделения фракций цитидинмонофосфата и НАД применена ступенчатая элюция 0,02 и 0,05 М муравьиной кислотой. Для ускорения работы мы одновременно применяли три колонки, которые устанавливали на одном коллекторе, а градиент создавали одной системой. Данный метод использован нами также для изучения скорости включения ^{32}P в отдельные компоненты нуклеотидного фонда.

Перед работой смолу дауэкс 1×8, 200×400 меш заливали 10 объемами воды и оставляли на 2 дня для набухания. Тонкую и грубую фракции, отделенные по скорости их оседания, отбрасывали. Смолу промывали на воронке со стеклофильтром 10 объемами ацетона, смесью ацетона со спиртом (1 : 1), спиртом, водой, концентрированной муравьиной кислотой до удаления окрашивающих веществ, снова водой до pH 6,0 и наносили на колонку размером 0,6×10 см. Перед работой смолу активировали 3 М формиатом натрия и промывали водой. После окончания работы колонку регенерировали 30 мл концентрированной муравьиной кислоты, промывали водой до pH 6—10, после чего промывали 20 мл спирта и снова водой.

Ткани мозга крысы, находящейся под эфирным наркозом, фиксировали погружением головы на 3 мин в жидкий азот. Мозг извлекали, дробили в замороженном состоянии, что позволяет предотвратить распад нуклеотидов [6], взвешивали и маленькими порциями измельчали стеклянным пестиком в притертой к нему центрифужной пробирке в 2 объемах холодной 0,6 н. хлорной кислоты, центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок дважды экстрагировали холодной 0,2 н. HClO_4 . Центрифугаты объединяли, нейтрализовали на холоду концентрированным КОН с использованием в качестве индикатора феноловый красный. Образовавшийся перхлорат калия отделяли центрифугированием. Надосадочную жидкость наносили на колонку, установленную в коллекторе. После прохождения экстракта нуклеотидов колонку промывали водой. Все растворы проходили через колонку со скоростью 12 мл в 1 ч, скорость движения коллектора 1 фракция за 20 мин. С 1-й по 6-ю фракцию водой элюировали нуклеозиды и азотистые основания. Начиная с 7-й фракции элюирование проводили 0,02 н. HCOOH , с 11-й фракции — 0,05 н. HCOOH . Эта процедура позволяет четко разделить ЦМФ, НАД и АМФ. После выхода 17-й фракции создавали градиент 0,05—4 н. муравьиной кислотой принудительной подачей 8 н. ее при помощи микронасоса в герметичный смеситель, укрепленный на магнитной мешалке и соединенный полиэтиленовой трубкой с колонкой. В смесителе содержалась 0,05 н. HCOOH в количестве 800 мл на 3 колонки. После выхода 57-й фракции 8 н. муравьиной кислоту, находящуюся в резервуаре, заменяли 2 н. муравьинокислым аммонием в 4 н. HCOOH . Процесс хроматографии заканчивался после выхода 80-й фракции.

Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре СФ-16 при 260 нм. Фракции, входящие в отдельные пики, объединяли, измеряли их объем и суммарную оптическую плотность. Пик 1, содержащий нуклеозиды и азотистые основания, а также пики 8 и 10, состоящие из смеси гуаниловых и уридилловых нуклеотидов, анализировали дополнительно при 280 нм. Пики идентифицировались по их положению на профиле элюции [1], концентрации элюирующего раствора [2], спектрам поглощения в интервале 250—290 нм [7, 8]. НАД определяли флюорометрически [9]. Разделяемые вещества распределялись по фракциям следующим образом:

1—4-я фракция — нуклеозиды и азотистые основания; 7—9-я ЦМФ; 11—15-я — НАД; 19—22-я — АМФ; 30—32-я — ГМФ; 34—38-я — ИМФ; 39—45-я — АДФ; 61—66-я — смесь ГДФ и УДФ-производных; 68—73-я — АТФ; 74—78-я — смесь УТФ и ГТФ. Для расчета содержания нуклеотидов в тканях мозга использовали коэффициенты их молярной экстинкции [7, 8]. Содержание уридиловых и гуаниловых производных определяли по соотношению их экстинкции при 260 и 280 нм. При помощи предлагаемого метода найдено, что содержание отдельных компонентов нуклеотидного фонда в мозге крыс составляет в микромолях на 1 г сырой ткани: АМФ — $0,414 \pm 0,017$, АДФ — $0,609 \pm 0,020$, АТФ — $1,44 \pm 0,048$, сумма АМФ, АДФ и АТФ — $2,54 \pm 0,127$, НАД — $0,277 \pm 0,015$, ГМФ — $0,024 \pm 0,001$, ГДФ — $0,188 \pm 0,014$, ГТФ — $0,255 \pm 0,090$, ИМФ — $0,085 \pm 0,004$, ЦМФ — $0,053 \pm 0,001$, УДФ-производных — $0,078 \pm 0,006$, УТФ — $0,052 \pm 0,005$, что хорошо согласуется с данными литературы [10]. Общее количество нуклеотидов, которое составляло $1,41 \pm 0,14$, выражали в единицах оптической плотности при 260 нм на 1 г ткани, поскольку качественный состав фракции неизвестен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hurlbert R. B., Schmitz H., Potter V. R. et al. — J. biol. Chem., 1954, v. 209, p. 23. — 2. Piccoli F., Samarda R., Bonavita V. — J. Neurochem., 1969, v. 16, p. 159. — 3. Живков В. И. — Биохимия, 1965, № 5, с. 1027. — 4. Венкстерн Т. В. — В кн.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот. М., 1973, с. 79. — 5. Вергмеуер Н. У. Methoden der enzymatischen Analyse. Berlin, 1970. — 6. Войскобойников Г. В. — Биохимия, 1966, № 5, с. 1041. — 7. Венкстерн Т. В., Баев А. А. Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот. М., 1967. — 8. Справочник по биохимии. Киев, 1971. — 9. Юденфренд С. (Udenfriend S.). Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., 1965. — 10. Mandler P., Hargth S. — J. Neurochem., 1961, v. 8, p. 116.

Поступила 14/II 1978 г.

A SEMI-MICROMETHOD FOR ESTIMATION OF ACID EXTRACTABLE NUCLEOTIDES IN TISSUES OF SMALL LABORATORY ANIMALS

M. M. Kireev, V. D. Kunyay

Central Research Laboratory, Medical School, Omsk

A quantitative semi-micromethod for estimation of acid extractable nucleotides was used in studies of nucleotide pool of rat brain. The nucleotides were chromatographed on Dowex 1X8 column using complex gradient profiles.

УДК 611-018.26:576.311.322.087.4

Ю. В. Бездробный, Н. Ю. Евдокимова

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ЖИРОВЫХ КЛЕТОК БЕЗ ПРИМЕНЕНИЯ КОЛЛАГЕНАЗЫ

Киевский научно-исследовательский институт эндокринологии и обмена веществ Министерства здравоохранения УССР

Описан метод выделения плазматических мембран (ПМ) жировых клеток из жировой ткани крыс без применения коллагеназы с помощью гомогенизации при комнатной температуре в больших объемах среды и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Полученные согласно предложенному методу ПМ обладают высокими удельными активностями 5'-нуклеотидазы и Na^+ , K^+ -АТФ-азы и высокой емкостью в отношении специфического связывания инсулина.

Интерес к изучению плазматических мембран (ПМ) клеток животных значительно возрос после того, как было установлено, что многие регуляторные воздействия на животные ткани осуществляются через ПМ их клеток. Жировая ткань привлекает к себе особое внимание, так как именно она

в значительной степени определяет липидный и углеводный обмен в организме [1]. Успехи в изучении ПМ жировых клеток в первую очередь определяются наличием надежного и не очень сложного метода их выделения в достаточно очищенном состоянии. В описанных методах для выделения ПМ жировых клеток [2, 3] или их «теней» (лишенные жирового содержимого клетки) [4] использовали свободные жировые клетки. Разрушение клеток производили различными способами: гомогенизацией [2], продавливанием через мелкопористые сита [3], осмотическим шоком [4]. Во всех указанных работах для получения свободных жировых клеток жировую ткань обрабатывали коллагеназой [5], применение которой затруднительно из-за ее дефицитности и, к тому же, нежелательно, так как содержащиеся в ее препаратах примеси протеаз способствуют дезагрегации тканей и могут вызвать разрушение белковых структур ПМ [6].

В предлагаемой работе описывается метод, позволяющий получить высокоочищенные препараты ПМ жировых клеток с хорошим выходом без применения коллагеназы.

Методика

Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 120—180 г. Животных забивали декапитацией, жир извлекали из брюшной полости и забрюшинного пространства, очищая от соединительной ткани и кровеносных сосудов и сразу же использовали для выделения ПМ. Замораживание жировой ткани на несколько дней приводило к значительному (в 5—10 раз) снижению активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы в выделенных ПМ.

Гомогенизация ткани является ответственным этапом, так как ею определяют и размеры, и степень гетерогенности фрагментов ПМ и образующихся из них везикул, от чего зависит поведение ПМ при дальнейшей очистке, и в частности их распределение при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Поэтому режим гомогенизации, обеспечивающий фрагментирование ПМ на однородные по размерам частицы, осаждающиеся отличным от других субклеточных частиц образом, должен строго соблюдаться при каждом выделении.

Мы испробовали несколько режимов гомогенизации, подготовки ткани к гомогенизации и две среды гомогенизации. Применение гипотонического раствора NaCl (0,45 М) при интенсивной гомогенизации и мягкой гомогенизации с интенсивным встряхиванием приводило к малому выходу ПМ с низкой удельной активностью K^+ , Na^+ -АТФ-азы. Гомогенизация в растворе А (0,25 М сахароза; 1 мМ ЭДТА; 10 мМ трис- HCl , рН 7,4) обеспечивала лучшее разделение компонентов и резкое повышение активности K^+ , Na^+ -АТФ-азы в выделенных ПМ.

Оптимальным признан следующий режим обработки жировой ткани. Извлеченный жир при комнатной температуре тщательно измельчали ножницами, продавливали сквозь пресс-сито из нержавеющей стали с отверстиями диаметром 0,1 мм и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком с зазором 0,2—0,4 мм (30—35 фракций) с 10 объемами раствора А. Гомогенат центрифугировали также при комнатной температуре 2 мин при 500 g. Промежуточный слой и осадок собирали в колбу и помещали на холод (4°C), а жировую лепешку, образовавшуюся сверху, переносили в гомогенизатор и вновь гомогенизировали в том же объеме раствора А. Эту процедуру повторяли 5—7 раз до тех пор, пока промежуточный слой не становился прозрачным, а жировая лепешка не уменьшалась в 2—3 раза.

Очистку ПМ из объединенных промежуточных слоев после их гомогенизации (10 фракций) и фильтрования через 2 слоя капроновой чулочной ткани проводил следующим образом. Пробы центрифугировали 30 мин при 60 000 g и 4°C. При этом микросомы оставались в надосадочной, а ПМ, митохондрии и ядра осаждались на дно (фракция грубых ПМ).

Осадок ресуспендировали в растворе А и по 0,8 мл наносили на линейный градиент сахарозы 20—45% в 5 мМ трис- HCl -буфере рН 7,4, содержащем 1 мМ ЭДТА. Градиент готовили в центрифужных пробирках 50×13 мм и центрифугировали в роторе SW-50 ультрацентрифуги «Spinco L265 В» или в роторе РКС-50 ультрацентрифуги УЦП-60 львовского завода «Биофизприбор» при 170 000 g 75 мин. В процессе ультрацентрифугирования материал грубых мембран разделялся на две фракции в градиенте и осадок на дне пробирки. Фракция I, отличавшаяся наибольшей активностью K^+ , Na^+ -АТФ-азы и 5'-нуклеотидазы, располагалась в области градиента с плотностью 1,10, а фракция II — в области с плотностью 1,16. Основываясь на этих данных, мы применили в дальнейшем для разделения фракций I и II ступенчатый градиент сахарозы (по 1,6 мл) 45, 30, 20% с плотностями соответственно 1,08, 1,12, 1,20. При указанном режиме ультрацентрифугирования фракция I локализовалась на границе 20 и 30% сахарозы, а фракция II — на границе 30 и 45% сахарозы.

Собранный материал фракций I и II и осадка ресуспендировали в 50 мл 0,9% NaCl и центрифугировали 30 мин при 4°C и 60 000 g. Полученные осадки ресуспендировали в небольших объемах раствора А и использовали для исследования с целью идентификации содержащихся в них субклеточных фракций.

Идентификацию субклеточных фракций проводили путем определения в них активности ферментов-маркеров ПМ: 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) [7], K⁺, Na⁺-АТФ-азы (КФ 3.6.1.3) [7] и сукцинат-цитохром с-редуктазы (КФ 1.3.99.1) [8] как фермента-маркера митохондрий. Для определения K⁺, Na⁺-АТФ-азы вместо оубаина использовали строфантин К в концентрации 10⁻⁴ М. Для идентификации материала ядер и митохондрий во фракциях определяли содержание ДНК и РНК орциновым методом [9]. Перед экстракцией нуклеиновых кислот объединяли аналогичные фракции, полученные от 3—4 опытов (в общей сложности из 10—15 г жировой ткани). Отсутствие ДНК в фракции I, показанное орциновым методом, подтвердилось также более чувствительным для ДНК методом Бартона [10].

Белок определяли методом Лоури в модификации Шаткина [11]. Взаимодействие инсулиновых рецепторов ПМ с гормоном изучали, как описано Фрейшетом и соавт. [12].

Результаты и обсуждение

Распределение активности двух ферментов-маркеров ПМ при очистке грубых ПМ в градиенте плотности сахарозы в типичном опыте показано в табл. 1, из которой видно, что основная часть активности ферментов-маркеров ПМ сосредоточена в фракции I, локализуемой при центрифугировании на границе растворов 20 и 30% сахарозы. В наших опытах фракция I содержит 70—75% активности K⁺, Na⁺-АТФ-азы и 5'-нуклеотидазы

Т а б л и ц а 1
Распределение белка (в мкг) и активности K⁺, Na⁺-АТФ-азы и 5'-нуклеотидазы (в мкмоль Р в 1 ч) во фракциях, получаемых при очистке грубых плазматических мембран

Фракция	Белок	Активность K ⁺ , Na ⁺ -АТФ-азы		Активность 5'-нуклеотидазы	
		общая	на 1 мг белка	общая	на 1 мг белка
I, 20—30% сахароза	448	8,1	18,1	10,1	22,6
II, 30—45% сахароза	707	3,0	4,3	2,2	3,1
Осадок	923	0	0	1,8	1,9
Суммарные величины	2078	11,1		14,1	
Грубые мембраны	2147	11,6	5,2	13,5	5,9

грубых мембран. Из табл. 1 также видно, что при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы активность указанных ферментов не теряется и что в результате такого центрифугирования достигается четырехкратная очистка ПМ. В отличие от этого Аврух и Валлах [3], выделявшие ПМ из обработанной коллагеназой жировой ткани, показали снижение активности 5'-нуклеотидазы и K⁺, Na⁺-АТФ-азы после центрифугирования в градиентах плотности декстрана (оба фермента) и сахарозы (5'-нуклеотидаза).

Рассчитать полный баланс ферментов-маркеров ПМ при очистке ПМ, начиная с лишнего жира гомогената, в нашем методе трудно из-за очень большого разведения гомогената. В исходном гомогенате не удается определить активность 5'-нуклеотидазы и K⁺, Na⁺-АТФ-азы, а активность суммарной K⁺, Na⁺, Mg²⁺-АТФ-азы в исходном гомогенате была в пределах 1,5—2,6 мкмоль в 1 ч на 1 мг белка.

Средние величины удельных активностей ферментов-маркеров ПМ и сукцинат-цитохром с-редуктазы (маркер митохондрий) для фракций, полученных из нескольких препаратов жировых ПМ, а также содержание РНК и ДНК в объединенных препаратах этих фракций представлены в табл. 2. Наибольшей удельной активностью 5'-нуклеотидазы и K⁺, Na⁺-АТФ-азы

характеризуется фракция I, наибольшей активностью сукцинат-цитохром с-редуктазы — фракция II. ДНК в наибольшем количестве обнаруживается в осадке, что говорит о содержащемся в нем материале клеточных ядер. ДНК и РНК во фракции II являются, по-видимому, нуклеиновыми кислотами митохондрий. В отличие от Маккилла и Яретта [2] мы не обнаружили в нашем препарате ПМ жировых клеток (фракция I) РНК, что подтверждает отсутствие в нем микросомальных примесей.

Удельная активность обоих ферментов-маркеров ПМ в наших препаратах ПМ жировых клеток вдвое выше, чем в препаратах, полученных в

Таблица 2

Ферментативная активность и содержание нуклеиновых кислот во фракциях, получаемых при очистке грубых плазматических мембран

Фракция	АТФ-аза	K ⁺ , Na ⁺ - АТФ-аза	5'-нуклеоти- даза	Сукцинат-ци- тохром с-ре- дуктаза, мкмоль вос- становленно- го цитохрома с в 1 ч на 1 мг белка (n=3)	ДНК	РНК
	мкмоль Р в 1 ч на 1 мг белка					
	n=5	n=3	n=3			
Грубые мембра- ны	16,0±1,7	4,7±1,4	5,6±1,2	0,04±0,01	33,8	13,8
I, 20—30% са- хароза	53,9±2,2	22,8±2,7	19,2±1,7	0,07±0,01	—	—
II, 30—45% сахароза	21,0±3,2	8,7±3,2	4,3±1,1	0,55±0,05	18,4	9,9
Осадок	5,4±0,4	0	1,4±0,3	0,13±0,03	58,0	10,0

работе [3]. В работе [2] активность 5'-нуклеотидазы в ПМ не обнаруживалась, а активность K⁺, Na⁺-АТФ-азы не определяли. Более высокая активность ферментов-маркеров ПМ в наших препаратах может быть связана с большей степенью их очистки, в частности, от микросом, примеси кото-

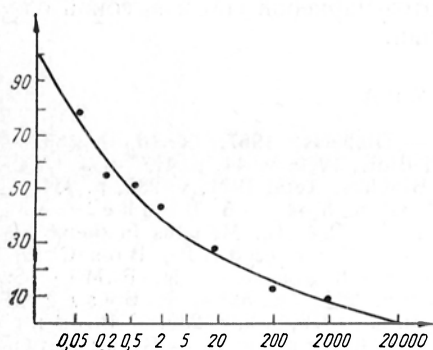


Рис. 1. Кривая вытеснения специфически связанного с рецепторами плазматических мембран жировых клеток ¹²⁵I-инсулина возрастающими количествами немеченого инсулина (средние данные для пяти препаратов мембран). По оси ординат — специфическое связывание ¹²⁵I-инсулина (в %), по оси абсцисс — количество немеченого инсулина (в мкг).

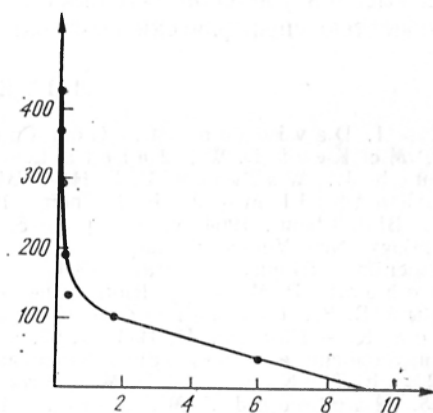


Рис. 2. График Скэтчарда, построенный по данным рис. 1.

По оси ординат — отношение специфически связанного ¹²⁵I-инсулина к свободному ($\times 10^3$), по оси абсцисс — специфически связанный ¹²⁵I-инсулин (в нг).

рых в препаратах ПМ указанных авторов [2, 3] составляли до 27% (судя по содержанию РНК и активности НАД·Н-оксидазы). Однако удельная активность сукцинат-цитохром с-редуктазы в нашем препарате ПМ выше.

Выход ПМ в описанных двух методах их выделения из обработанных коллагеназой жировых клеток составлял 1,0—1,5 мг белка ПМ из 20—

25 мг белка гомогената [2] и 400 мкг белка ПМ из 25 мг белка гомогената [3]. С помощью описанного здесь метода мы получали 250—350 мкг белка мембран из 1 г жировой ткани, что соответствует, согласно данным о содержании белка в жировых клетках [4], приблизительно 9 мг белка.

В качестве дополнительных критериев чистоты и интактности выделенных жировых ПМ мы использовали также показатели взаимодействия инсулина с локализованными в ПМ инсулиновыми рецепторами. Характеристики инсулин-рецепторного взаимодействия определяли в условиях равновесия по вытеснению ^{125}I -инсулина из комплекса с рецепторами возрастающими количествами немеченого инсулина. На рис. 1 представлена такая кривая вытеснения, построенная по средним величинам для пяти различных препаратов ПМ. Константа диссоциации комплекса гормон — рецептор, определенная по этой кривой как концентрация немеченого инсулина, вызывающая полумаксимальное вытеснение ^{125}I -инсулина, равна $4,3 \cdot 10^{-10}$ М. Эта величина соответствует величинам K_d для инсулин-рецепторного комплекса в интактных жировых клетках [13—15] и, следовательно, говорит об интактности выделенных ПМ в отношении инсулиновых рецепторов.

На рис. 2 представлен построенный на основании кривой рис. 1 график Скэтчарда [16], который показывает зависимость отношения количества связанного инсулина к свободному от количества связанного инсулина. По отсечению оси абсцисс кривой Скэтчарда можно судить о количестве мест связывания в содержащем рецепторы материале. В данном случае 1 мг белка нашего препарата ПМ связывает $1,5 \cdot 10^{-9}$ моль инсулина. Полученная величина на несколько порядков выше величин, полученных другими авторами при изучении взаимодействия инсулина с ПМ жировых клеток [17, 18], выделенными с применением коллагеназы. Емкость связывания инсулина также свидетельствует о высокой степени очистки ПМ в нашем препарате.

Таким образом, описанный метод позволяет без применения коллагеназы получить с высоким выходом ПМ жировых клеток, характеризующиеся высокой удельной активностью ферментов-маркеров ПМ и высокой способностью специфически связывать инсулин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davidson M., Goodner C. — *Diabetes*, 1967, v. 16, p. 386. —
2. Mc Keel D. W., Jarrett L. — *J. Cell Biol.*, 1970, v. 44, p. 417. — 3. Avruch J., Wallach D. F. H. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, v. 233, p. 334. —
4. Rodbell M. — *J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242, p. 5744. — 5. Rodbell M. — *J. Biol. Chem.*, 1964, v. 239, p. 375. — 6. Kahn R. — In: *Methods in membrane biology*. New York — London, 1975, v. 3, p. 81. — 7. Emmelot P., Bos C. J. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, v. 90, p. 1. — 8. Green D. E., Mii S., Kohout P. M. — *J. Biol. Chem.*, 1955, v. 217, p. 551. — 9. Бездробный Б. В., Германюк Я. Л. — *Ур. биохим. ж.*, 1976, т. 2, с. 239. — 10. Vurton K. — *Biochem. J.*, 1956, v. 62, p. 315. — 11. Шаткин А. — В кн.: *Методы вирусологии и молекулярной биологии*. М., 1972, с. 187. — 12. Freychet P., Roth J., Neville D. M. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, p. 1833. —
13. Hammond J. M., Jarrett L., Mariz I. K. et al. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 49, p. 1122. — 14. Kono T., Barham F. W. — *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 6210. — 15. Cuatrecasas P. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, p. 1264. — 16. Scatchard G. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, v. 51, p. 660. — 17. Cuatrecasas P. — *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 248, p. 2202. — 18. Freychet P., Laudat M. H., Laudat P. R. et al. — *FEBS Lett.*, 1972, v. 25, p. 339.

Поступила 15/III 1978 г.

ISOLATION OF PLASMATIC MEMBRANES OF FATTY CELLS WITHOUT THE USE OF COLLAGENASE

Yu. V. Bezdrobny, N. Yu. Evdokimova

Research Institute of Endocrinology and Metabolism, Ministry of Public Health
of the Ukrainian SSR, Kiev

A method is described for isolation of plasmatic membranes of rat fatty cells immediately from fatty tissue without the treatment with collagenase. Homogenization of fatty tissue was carried out in large volumes of buffered sucrose and EDTA at room temperature followed by sucrose density gradient centrifugation. The preparations obtained exhibited high specific activity of the marker enzymes of plasmatic membranes (5'-nucleotidase and K^+, Na^+ -ATPase), as well as high ability for specific binding of insulin.

УДК 616.153.1:577.152.311.042.5]-074

М. О. Мхеидзе, Н. А. Пекарская, А. М. Шапошников

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Отдел медицинской энзимологии Центральной научно-исследовательской лаборатории
I Ленинградского медицинского института им. И. П. Павлова

Предложен экспресс-метод выявления носителей дибукаинрезистентного и «молчащего» вариантов холинэстеразы сыворотки крови человека. Обследовано 200 доноров и 25 больных с различными патологическими состояниями; выявлено 5 носителей дибукаинрезистентной холинэстеразы, что составляет в данной выборке 2,22%. Метод может быть использован анестезиологической службой, службой переливания крови, в исследованиях по медицинской генетике.

Введение в анестезиологическую практику деполяризующего миорелаксанта сукцинилдихолина (синонимы: листенон, дитилин) и наблюдаемые тяжелые осложнения у ряда людей после его поступления в организм послужили основой для изучения генетического полиморфизма холинэстеразы (КФ 3.1.1.8) сыворотки крови человека [1, 2]. В настоящее время установлено 4 варианта этого фермента: типичный U, дибукаинрезистентный D, фторидрезистентный F и «молчащий» S, кодируемые 4 аллелями одного аутосомного локуса E_{1u} , E_{1d} , E_{1f} и E_{1s} соответственно [3]. Последние 3 варианта (атипичные холинэстеразы) отличаются от типичного фермента более высокими значениями K_M по отношению к ряду субстратов [4], относительно высокой устойчивостью к действию ингибиторов холинэстеразы, содержащих положительно заряженный атом азота в четвертичной аммониевой группе или в замещенной аминогруппе [5]. Четыре аллеля холинэстеразы дают 10 генотипов, причем у людей, гомозиготных (генотипы $E_{1d}E_{1d}$, $E_{1f}E_{1f}$, $E_{1s}E_{1s}$) или гетерозиготных (генотипы $E_{1d}E_{1f}$, $E_{1d}E_{1s}$, $E_{1f}E_{1s}$) по атипичным холинэстеразам, после введения сукцинилдихолина развиваются паралич поперечно-полосатой мускулатуры и длительное апноэ или злокачественная гипертермия [3, 6]. При введении этого препарата людям, гомозиготным по типичной холинэстеразе (генотип $E_{1u}E_{1u}$), наступает лишь кратковременная задержка дыхания на 2—5 мин [7].

Установлено, что 5—8% людей являются гетерозиготными носителями дибукаинрезистентного варианта холинэстеразы (генотип $E_{1u}E_{1d}$) [8, 9]. Показано, что при лечении людей с таким генотипом совместное применение нейролептанальгезии (дроперидол, фентанил) и сукцинилдихолина приводит к длительному апноэ [10]. С целью предотвращения тяжелых осложнений при введении указанных препаратов необходимо обязательное выявление гомо- и гетерозиготных носителей атипичных вариантов холинэстеразы.

Существующие спектрофотометрические микрометоды идентификации вариантов холинэстеразы [11—13] трудоемки и непригодны для массового выявления носителей атипичных форм фермента как в клинической практике, так и среди общей популяции. В настоящей работе представлен разработанный нами экспресс-метод для массового выявления носителей атипичных вариантов холинэстеразы.

Методы исследования

В основу метода положена пропись Харриса и Робсон [14]. Принцип метода состоит в том, что α -нафтол, образующийся из α -нафтилацетата в присутствии холинэстеразы сыворотки крови, дает окрашенный комплекс с диазореактивом (5-хлор-о-толуидин, прочный красный ТР). Введение совкаина — ингибитора холинэстеразы — резко снижает скорость образования окрашенного комплекса в присутствии типичной холинэстеразы и не влияет на гидролиз α -нафтилацетата дибукаинрезистентной холинэстеразой.

Сыворотку крови (0,1 мл) разводят в 10 и 30 раз дистиллированной водой и вносят в агаровые пластинки, которые готовят следующим образом: 1,5 г агара (агар «Бакто» фирмы «Гегак», ФРГ) замачивают на 12 ч в 50 мл дистиллированной воды, затем доводят объем до 100 мл 0,2 М трис-НСI-буфером рН 7,4, нагревают на водяной бане до получения прозрачного раствора. Половину приготовленного агара охлаждают до 60°C и добавляют в него совкаин (синоним: дибукаин) в конечной концентрации 10^{-3} М (38 мг совкаина на 100 мл агара) и тщательно перемешивают. Агар с совкаином и агар без совкаина наслаивают отдельно на обезжиренные эфиром стеклянные пластины, толщина агарового слоя 3 мм. В застывшем агаре проделывают лунки диаметром 4 мм на расстоянии 2,5—3 см друг от друга. Затем по 0,02 мл разведенной в 30 раз сыворотки вносят в 2 лунки агара, не содержащего совкаин, такое же количество сыворотки, разведенной в 10 раз, вносят в 2 лунки агара, содержащего совкаин. После этого агаровые пластинки инкубируют во влажной камере в термостате при 36°C в течение 12 ч. Затем каждую агаровую пластинку помещают в чашку Петри и заливают для окрашивания свежеприготовленной смесью, состоящей из 50 мл 0,2 М Na, К-фосфатного буфера рН 7,4, охлажденного до 6°C, 0,5 мл 1% раствора α -нафтилацетата и 0,5 мл 2% раствора прочного красного ТР фирмы («Chemapol», Чехословакия), приготовленных на смеси вода — ацетон в соотношении 1 : 1. Чашки Петри помещают на 2 ч в термостат при 36°C. После этого окрашивающую смесь сливают, агаровые пластинки отмывают дистиллированной водой, фиксируют окраску 7% уксусной кислотой в течение 5 мин и проводят определение типа фермента.

Высушенные агаровые пластинки не меняют интенсивности окраски в течение 24 мес при хранении в темном сухом месте.

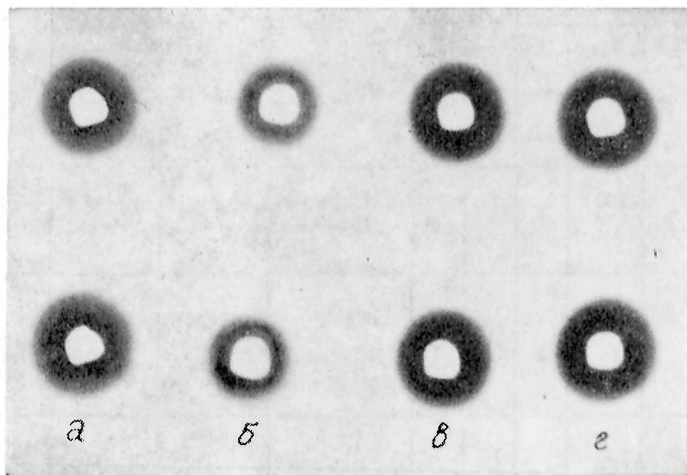
Результаты и обсуждение

Определение типа холинэстеразы проводят на основании визуальной оценки цвета и интенсивности окраски зон вокруг лунок. Три типа окраски дают возможность идентифицировать типичную (нормальную) и мутантные (дибукаинрезистентная и «молчащая») формы. Интенсивно коричневая окраска агара без совкаина и розовая окраска агара, содержащего совкаин, свидетельствуют о наличии типичной холинэстеразы (см. рисунок, а, б). Интенсивно коричневая окраска в обоих агарах развивается при наличии в сыворотке крови атипичной дибукаинрезистентной формы (см. рисунок, в, г). Розовое окрашивание на обоих агарах указывает на наличие в сыворотке крови атипичной «молчащей» формы холинэстеразы.

Описанным экспресс-методом нами были исследованы сыворотки крови 200 доноров, 2 хирургических больных, давших длительное апноэ на введение терапевтических доз сукцинилдихолина, 11 больных с респираторными аллергиями, 6 больных с недифференцированной олигофренией, 4 больных с фецилкетонурией и 2 больных с синдромом Леш-Нихана. Среди 225 обследованных людей выявлено 5 носителей атипичной дибукаинрезистентной формы холинэстеразы (см. таблицу), что составляет 2,22%. В обследованной группе не выявлены носители атипичной «молчащей» формы фермента.

Для оценки точности результатов, полученных с помощью экспресс-метода, 5 образцов сывороток крови носителей атипичной дибукаинрезис-

тентной формы, а также сыворотки крови всех больных и 13 доноров были исследованы спектрофотометрическими методами, как описано в работах [11—13]. Как видно из таблицы, определение типов холинэстеразы этими методами полностью подтвердило результаты, полученные экспресс-методом. Таким образом, экспресс-метод может быть использован как скрининг-тест для массового выявления дибукаинрезистентного и «молчащего» вариантов холинэстеразы. Последующий спектрофотометрический анализ сывороток крови людей с атипичным дибукаинрезистентным типом реакции



Определение типов холинэстеразы сыворотки крови человека по интенсивности окраски.

а — сыворотка крови, содержащая типичную холинэстеразу (разведение 1 : 30, агар без добавления соевкаина); *б* — та же сыворотка крови, содержащая типичную холинэстеразу (разведение 1 : 10, агар с соевкаинном); *в* — сыворотка крови, содержащая атипичную (дибукаинрезистентную) холинэстеразу (разведение 1 : 30, агар без добавления соевкаина); *г* — та же сыворотка крови, содержащая атипичную (дибукаинрезистентную) холинэстеразу (разведение 1 : 10, агар с соевкаинном).

позволяет установить фенотипическую характеристику холинэстеразы и определить генотип носителя. Так, один донор с атипичным дибукаинрезистентным типом, по данным экспресс-метода, является гетерозиготным носителем дибукаинрезистентной формы холинэстеразы, о чем свидетельствует снижение дибукаинового и фторидного чисел, в то время как остальные доноры имеют числа, характерные для гомозиготных носителей типичного варианта холинэстеразы. Анализ этого фермента у больных с длительным анамнезом показал, что один из них является гетерозиготным носителем дибукаинрезистентной формы, а другой — гомозиготным носителем этого варианта, так как дибукаиновое и фторидное числа для первого составляют 66 и 58, а для второго — 27 и 37 соответственно. Гетерозиготные носители дибукаинрезистентного варианта холинэстеразы также выявлены среди больных респираторными аллергозами (1) и с синдромом Леш-Нихана (1). Кроме того, с помощью спектрофотометрического метода исследования сывороток крови выявлено 2 гетерозиготных носителя (один — среди больных фенилкетонурией и другой — среди больных респираторными аллергозами) фторидрезистентной формы холинэстеразы, которая не может быть дифференцирована экспресс-методом. Отсутствие носителей «молчащего» варианта среди 225 обследованных людей объясняется малочисленностью выборки, так как этот тип холинэстеразы в европейской популяции встречается гораздо реже, чем дибукаинрезистентный вариант фермента [8]. Однако частота гомозиготного носительства «молчащего» варианта холинэстеразы чрезвычайно высока среди эскимосов Аляски, где она составляет 1,5% [15]. Поэтому выявление сукцинилдихолинчувствительных людей с

этим типом холинэстеразы среди народов Севера экспресс-методом даст возможность предупредить тяжелые лекарственные осложнения.

Экспресс-метод может быть использован анестезиологической службой для предупреждения лекарственных осложнений при оперативных вмешательствах, службой переливания крови для выявления доноров — носи-

Определение типов холинэстеразы сыворотки крови экспресс-методом и спектрофотометрическими методами

Группа обследованных	Экспресс-метод		Спектрофотометрические методы						
	тип окраски		тип реакции		активность холинэстеразы	дибуканное число	фторидное число	генотип	
	Н	АД	Н	АТ					
Доноры	199	1	13	1	0,312±0,007 0,250	84±0,1 73	72±0,4 60	E ₁ u +E ₁ u	E ₁ u E ₁ d
Больные с длительным апноэ	0	2	0	1 1	0,065 0,212	66 27	58 37	+E ₁ u +E ₁ d	E ₁ d E ₁ d
Больные с респираторными аллергиями	10	1	9	1 1	0,267 0,470	68 81	58 57	E ₁ u +E ₁ u +E ₁ u	E ₁ u E ₁ d E ₁ f
Больные олигофренией	6	0	6	0				E ₁ u	E ₁ u
Больные фенилкетонурией	4	0	3	1	0,292	82	59	E ₁ u +E ₁ u	E ₁ u E ₁ f
Больные с синдромом Леш—Нихана	1	1	1	1	0,405	75	53	E ₁ u +E ₁ u	E ₁ u E ₁ d

Примечание: Н — нормальные типы окраски и реакции, АД — атипичный дибуканнрезистентный тип холинэстеразы, АТ — атипичный тип реакции. Активность холинэстеразы выражена в мкмольх бензоилхолина на 1 мл сыворотки крови за 1 мин. Дибуканное число — степень ингибирования активности холинэстеразы совкаином (в %), фторидное число — степень ингибирования активности холинэстеразы фторидом натрия (в %). Все сыворотки больных с нормальными типами реакций характеризуются такими же значениями активности, что и доноры (генотип E₁u E₁u). + повышенная чувствительность к сукцинилдихолину.

телей атипичных вариантов холинэстеразы, при профессиональном отборе людей, имеющих контакт с фосфорорганическими соединениями, а также в исследованиях по медицинской генетике (фармакогенетика, геногеография, медико-генетическое консультирование).

ЛИТЕРАТУРА

1. Evans F. F., Gray P. W., Lehmann H. et al. — Lancet, 1952, v. 1, p. 1129—1230. — 2. Lehmann H., Ryan E. — Ibid., 1959, v. 2, p. 124—126. — 3. Харрис Г. (Harris H.) Основы биохимической генетики человека.

- M., 1973. — 4. Davies R. O., Marton A. V., Kalow W. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1960, v. 38, p. 545—550. — 5. Kalow W., Davies R. O. — *Biochem. Pharmacol.*, 1958, v. 7, p. 183—185. — 6. Whittaker M. — *Brit. J. Anaesth.*, 1977, v. 49, p. 393—395. — 7. Kalow W. *Pharmacogenetics; Heredity and the Response to Drugs*. Philadelphia, 1962. — 8. Lubin A. H., Garry P. J., Owen G. M. — *Science*, 1971, v. 173, p. 161—164. — 9. Beckman G. — In: *The Biochemical Genetics of Man*. Eds. D. J. H. Brock, O. Mayo. London, 1972, p. 167—218. — 10. Мхеидзе М. О., Фридлянд М. И. — *Анест. и реаниматол.*, 1977, № 2, с. 51—53. — 11. Kalow W., Lindsay H. A. — *Canad. J. Biochem.*, 1955, v. 33, p. 568—574. — 12. Kalow W., Genest K. — *Ibid.*, 1957, v. 35, p. 339—346. — 13. Harris H., Whittaker M. — *Nature*, 1961, v. 191, p. 496—498. — 14. Harris H., Robson E. B. — *Lancet*, 1963, v. 2, p. 218—221. — 15. Gutsche B. B., Scott E. M., Wright R. C. — *Nature*, 1967, v. 215, p. 322—323.

Поступила 5/IV 1978 г.

AN EXPRESS METHOD FOR EVALUATION OF THE MUTANT FORMS OF CHOLINESTERASE IN HUMAN BLOOD SERUM

M. O. Mkhaidze, N. A. Pekarskaya, A. M. Shaposhnikov

Department of Medical Enzymology, Central Research Laboratory, I. P. Pavlov I Medical School, Leningrad

An express method is developed for detection of patients carrying dibucaine-resistant and «silent» variants of cholinesterase in blood serum. 200 donors as well as 25 patients with various pathological syndroms were examined; 5 patients carrying dibucaine-resistant cholinesterase were detected, which constituted 2.22% in the group. The method might be used in anesthesiology, blood transfusion and in experimental studies of the problems of medical genetics.

РЕЦЕНЗИИ

УДК 612.74.014.423:577.1(049.32)

А. А. Болдырев. *Биохимические аспекты электромеханического сопряжения*. Изд-во Московского университета, 1977, 208 с.

В медицинской биохимии остро стоит проблема понимания механизмов изменений в мышцах, наблюдающихся при ряде патологических состояний — миопатии, миодистрофии и др. Проблеме электромеханического сопряжения, т. е. вопросам регуляции сокращения скелетных мышц позвоночных, регуляции сократительного цикла в целом при возникновении возбуждающего постсинаптического потенциала на сарколемме и генерации потенциала действия посвящена монография А. А. Болдырева. Эта оригинальная и фундаментальная работа является практически первым детальным и критическим обобщением по рассматриваемой проблеме в СССР и за рубежом. Важно и то обстоятельство, что анализ данной проблемы в значительной мере основан на собственных исследованиях автора, проводимых на кафедре биохимии биологического факультета Московского университета под руководством акад. С. Е. Северина.

В книге, отлично оформленной и изданной, подробно рассмотрены узловые моменты регуляции электромеханического сопряжения и регуляции сокращения быстрых и медленных скелетных мышц по сигналу центральной нервной системы.

По мнению автора, такими узловыми моментами являются: реакция возбуждающего медиатора — ацетилхолина с Н-холинорецептором, индуцирующая инактивацию транспортной электрогенной Na, К-АТФ-азы сарколеммы и снижение трансмембранного потенциала, увеличение пассивного транспорта катионов и генерацию потенциала действия; высвобождение из мембран в саркоплазму Ca^{2+} , являющегося триггером выхода массивных количеств Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума; связывание свободного Ca^{2+} с тропонин-тропомиозиновой системой регуляторов образования комплекса актомиозина и сокращения; активный транспорт Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум и расслабление актомиозина; регуляция цикла сокращения своеобразными внутримышечными гормонами — гистидиновыми дипептидами и системой циклических нуклеотидов. Как справедливо указывает автор, главное, что отличает между собой типы мышц (скелетные, гладкие и

сердечные) — это не механизм сокращения, а способы его регуляции. Из перечисленных выше узловых моментов, пожалуй, упущено лишь малоизученное действие катехоламинов на пре- и постсинаптические структуры нервно-мышечных синапсов и на процесс сокращения скелетных мышц.

Книга состоит из 4 разделов. В первом разделе анализируются свойства и функции транспортной Na, K-АТФ-азы клеточных мембран, в том числе и сарколеммы. Этот фермент, открытый в 1957 г., имеет непосредственное отношение к функционированию натриевого насоса. Детально разобрана молекулярная организация натриевого насоса, механизм гидролиза АТФ и его сопряжение с электрогенным переносом Na^+ и K^+ . Наиболее интересны и информативны в изложении этого раздела три аспекта: роль липидов в функционировании Na, K-АТФ-азы, особенно холестерина, который в сарколемме содержится в довольно большом количестве; ингибирующее действие ацетилхолина на Na, K-АТФ-азу скелетных мышц и сердца, опосредованное через соответствующие холинорецепторы; роль натриевого насоса при патологии мышц. Вызывают интерес сведения о том, что при денервации мышц ингибирующее действие ацетилхолина резко возрастает, по-видимому, по аналогии с n-холинорецепторами благодаря индукции синтеза новых молекул фермента. Несомненно, данные об «ацетилхолиновом эффекте» имеют приоритетный характер, хотя надо признать, что этот эффект требует еще детального изучения. По мнению автора, другая транспортная АТФ-аза — кальциевая — отсутствует в сарколемме и присутствует лишь в мембранах саркоплазматического ретикулула.

Второй раздел книги посвящен саркоплазматическому ретикулуму — главному компоненту электромеханического сопряжения, определяющему характер сократительной реакции. В этом разделе анализируются триггерное действие высвобожденного из сарколеммы Ca^{2+} (в результате реакции ацетилхолина с холинорецептором) на процесс пассивного выхода Ca^{2+} из его депо хранения — саркоплазматического ретикулула, регуляция пассивного и активного транспорта Ca^{2+} через мембраны ретикулула величиной и длительностью деполяризации. Подробно разобрана молекулярная организация ретикулула, свойства и функции транспортной Ca-АТФ-азы, механизм депонирования Ca^{2+} внутри ретикулула. На основании собственных данных автор приходит к выводу, что вход и выход Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула осуществляется одной и той же саморегулируемой системой транспорта. Анализируется действие кофеина на процесс сокращения путем усиления выхода Ca^{2+} из ретикулула. В связи с этим обсуждается гипотеза о высвобождении эндогенного регулятора из так называемого внутреннего синапса в мышцах.

В третьем разделе коротко рассмотрены свойства миофибриллярных белков, особенно тропонина и тропомиозина, обсуждены современные модели сократительного цикла. Здесь, как и в предыдущих разделах, отображена возможная роль протенинкиназы, чувствительной к циклическим нуклеотидам, в фосфорилировании специфических белков в системе электромеханического сопряжения.

В четвертом разделе анализируется действие гистидиновых дипептидов как регуляторов мышечного сокращения. Эти дипептиды действуют на химически и электрически возбудимые области сарколеммы и регулируют распространение возбуждения внутри мышечного волокна. При этом наблюдается активация Na, K-АТФ-азы сарколеммы и Ca-АТФ-азы мембран саркоплазматического ретикулула. В этих условиях процесс восстановления исходного состояния мышцы после сокращения ускоряется. Автор указывает, что появление в процессе эволюции дипептидов определило важнейшее качество произвольной мускулатуры — способность к быстрому сократительному ответу.

Книгу А. А. Болдырева можно с успехом рекомендовать читателям и прежде всего тем специалистам, которых интересуют как теоретические, так и практические вопросы медицинской биохимии и мембранологии.

Ю. А. В л а д и м и р о в, Р. Н. Г л е б о в (Москва)

Поступила 14/II 1978 г.

УДК 615.015:577.2(049.32)

Краткий курс молекулярной фармакологии. Под общей редакцией П. В. Сергеева. II Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова, 1975, 1976, 338 с.

Рецензируемая книга представляет собой обобщение материалов, доложенных на Всесоюзной школе по молекулярной фармакологии. Она состоит из 4 разделов, включающих 13 глав, написанных видными учеными-фармакологами, и охватывает современное состояние по отдельным аспектам молекулярной фармакологии.

В первой главе П. В. Сергеев излагает историю возникновения, развитие и перспективы молекулярной фармакологии, основная задача которой — изучение первичных реакций между лекарственными веществами и макромолекулами биологических субстратов. Молекулярная фармакология выделилась в самостоятельный раздел фармакологической науки в 60-е годы нашего столетия. За это время достигнуты значительные успехи и намечаются конкретные пути дальнейшего развития в этой области. Особую важность в изучении механизма действия фармакологических препаратов имеют исследования взаимодействия их с рецепторами и мембранными структурами клетки. Не менее важно и выяснение механизма тканевой чувствительности к лекарственным веществам.

Во второй главе, написанной Т. Н. Прянишниковой, показано значение в механизме действия анестетиков и анальгетиков их физико-химических свойств, таких, как константа ионизации, коэффициент распределения между плотной и жидкой фазой нерва, поверхностная активность.

Различия фармакологического действия лекарственных веществ зависят от скорости их всасывания, распределения, депонирования и т. д. Этим вопросам посвящена третья глава, написанная Э. М. Халиловым, о метаболизме лекарственных веществ в организме. В ней рассматривается роль эндоплазматического ретикулума, ферментов микросом, эндокринных факторов, принимающих участие в метаболизме лекарственных веществ.

Второй раздел посвящен лекарственной рецепции. В нем рассматриваются теоретические вопросы фармакологической рецепции. Детально изучены рецепторы ацетилхолина, адреналина, белково-пептидных и стероидных гормонов.

Для механизма действия фармакологических препаратов важное значение имеет проницаемость клеточных мембран, структурными элементами которых являются рецепторы. На примере стероидных гормонов показано участие циторекпторов в действии гормонов.

Фармакологической регуляции метаболизма и биосинтеза биологически активных веществ посвящен третий раздел книги, включающий данные о простагландинах, катехоламинах и др. Показана связь между химическим строением простагландинов и их производных с фармакологической активностью. Это открывает перспективы для создания новых препаратов более избирательного действия, чем природные соединения. Катехоламинам принадлежит важная роль в реализации действия ряда лекарственных препаратов, чему в книге отведено значительное место.

В четвертом разделе рассматриваются вопросы действия метаболитов как лекарственных веществ при сердечной патологии, вазоактивных средств и диуретиков.

В книге много фактического материала, она хорошо иллюстрирована. Ценно также и то, что после каждой главы имеются резюме и большой указатель литературы. Из приведенных материалов видно, насколько фундаментально разрабатываются вопросы действия лекарственных веществ на молекулярном уровне.

К сожалению, в ней отсутствуют сведения о фармакологической регуляции серотонина, гистамина, кининов и их рецепторов, следовало бы выделить специальный раздел, посвященный взаимодействию лекарственных веществ и нуклеиновых кислот.

Выход в свет «Краткого курса молекулярной фармакологии» следует рассматривать как важный этап в создании подобного рода руководств.

Б. С. К а с а в и н а, В. П. Т о р б е н к о

СОДЕРЖАНИЕ

- Бычков С. М., Захарова М. М. Новые данные о гликозаминогликанах и протеогликанах 227
- Барашнев Ю. И., Семячкина А. Н. Состояние соединительной ткани при гомотестинурии 238
- Карпицкий В. В., Гуз С. Я. Влияние преципитирующих антител к панкреатическому калликреину на контактную активацию аргинин-эстеразы крови человека и кролика 242
- Конюхова Л. К., Малахов В. Н. Использование α -кетобутирата для дифференциального определения активностей субъединиц изоферментов лактатдегидрогеназы 245
- Нигуляну В. И. Некоторые биохимические изменения в надпочечниках и их функция при механической травме 251
- Десятниченко К. С. Об участии белково-липидных комплексов в минерализации зубной эмали 255
- Чумаков В. Н., Осипская Л. Ф. Активность цинк-, медьсодержащей супероксиддисмутазы в тканях крыс в норме и при гипоксии 261
- Токаева Л. К., Царева Т. Д. Сезонные колебания показателей калликреин-кининовой системы 266
- Куликова А. И., Романчук Л. А., Тугушева Ф. А., Чупрасов В. Б., Шостка Г. Д. Влияние гемодиализа на активность ацетилхолинэстеразы и аденозинтрифосфатазы эритроцитов при хронической почечной недостаточности 268
- Новикова Н. А. Изменения содержания норадrenalина в миокарде кроликов при электростимуляции дуги аорты 272
- Богдарин Ю. А. Влияние анаболических стероидных гормонов на показатели белкового и липидного обмена при термической травме 274
- Подгородниченко В. К., Цыпляковская Л. М., Саенко А. С., Брыксина Л. Е., Поверенный А. М. Факторы, влияющие на ДНК-связывающую активность сы-

CONTENTS

- Bychkov, S. M., Zakharova, M. M.: Modern data on glycosaminoglycans and proteoglycans 227
- Barashnev, Yu. I., Semyachkina, A. N.: The State of Connective Tissue in Homocystinuria 238
- Karpinsky, V. V., Guz, S. Ya.: Effect of the Precipitating Antibodies Against Pancreatic Kallikrein on the Contact Activation of Arginine Esterase in Human and Rabbit Blood 242
- Konyukhova, L. K., Malakhov, V. N.: Use of α -ketobutyrate for differential estimation of activity of lactate dehydrogenase isozyme subunits 245
- Nigulyanu, V. I.: Some Biochemical Alterations in Adrenal Glands and Their Role in Mechanical Trauma 251
- Desyatnichenko, K. S.: On the Participation of Lipoprotein Complexes in Mineralization of Dental Enamel 255
- Chumakov, V. N., Osipskaya, L. F.: Activity of Zn²⁺, Cu²⁺-containing Superoxide Dismutase From rat Tissues in Normal State and under Hypoxia 261
- Tokaeva, L. K., Tsareva, T. D.: Season Variations in Patterns of Kallikrein-Kinine System 266
- Kulikova, A. I., Romanchuk, L. A., Tugusheva, F. A., Chuprasov, V. B., Shostka, G. D.: Effect of Hemodialysis on Activity of Acetylcholinesterase and Adenosine Triphosphatase from Erythrocytes in Chronic Kidney Insufficiency 268
- Novikova, N. A.: Impairments in Tissue Noradrenaline Content in Rabbit Myocardium, Caused by Electrostimulation of Aortic Arch 272
- Bogdarin, Yu. A.: Effect of Anabolic Steroid Hormones on the Patterns of Protein and Lipid Metabolism in Thermic Burns 274
- Podgorodnichenko, V. K., Tsyplyakovskaya, L. M., Saenko, A. S., Bryksina, L. E., Poverenny, A. M.: Factors, Affecting the DNA-Binding Properties of Human Blood Serum

- воротки крови больных и здоровых людей в условиях низкой ионной силы 278
- Минина Л. С. Отбор препаратов с предполагаемой антиэстрогенной активностью 283
- Галоян А. А., Абелян Ж. Г., Басев В. В., Тер-Татевосян Л. П., Парсаданян Г. К. Молекулярные механизмы регуляции гипоталамическим гексапептидом некоторых звеньев обмена гликогена 285
- Куликов В. Ю., Ермолаева В. В., Колесникова Л. И., Молчанова Л. В., Косованова Л. В. Реакции перекисного окисления липидов в сыворотке крови больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки 289
- Банников Г. А., Чипышева Т. А. Получение моноспецифических антител к А-белку и иммунохимическое изучение его распределения в нормальных и опухолевых тканях 292
- Песчанский В. С., Либинсон Г. С. Физико-химические аспекты механизма минерализации эпифизарного хряща при энхондральном остеогенезе 297
- Платонова Т. К., Петренко О. А. Характеристика активатора плазминогена человека и фракции фибринолитически активной плазмы, обогащенной этим ферментом 302
- Волжина - Атабегова Н. Г. Активность окислительных ферментов цикла Кребса в головном мозге при гипотермии 308
- Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С., Арзанунц Э. М. Значение исходной активности моноаминоксидазы для развития активирующего или ингибирующего действия индолилгидразидов 311
- Аствацатурьян А. Т., Ставиский И. М., Губарева А. Е., Алимова Е. К. Биосинтез арахидоновой кислоты в тонкой кишке крыс 314
- Мужиченко А. В., Никольская О. Н., Хардина Г. А. Гепатотоксичность липидных компонентов липополисахаридов брюшно-тифозных бактерий 319
- Холмина Г. В., Горкин В. З. Об окислении жирно-ароматических альдегидов в тканях печени 322
- Горошинская И. А. Активность моноаминоксидаз типов А и В в условиях гипербарической оксигенации 328
- Барабаш Р. Д., Гукевич Е. К., Березовская З. В., Варава Г. Н., Левицкий А. П., Дяченко Ю. В. Роль Under Normal and pathological States at Low Ionic Strength
- Minina, L. S.: Selection of Preparations with Anticipated Antiestrogenic Activity
- Galoyan, A. A., Abelyan, Zh. G., Baev, V. V., Ter-Tatevosyan, L. P., Parsadanyan, G. K.: Molecular Mechanisms in Regulation by a Hypothalamic Hexapeptide of Some Steps in Glycogen Metabolism
- Kulikov, V. Yu., Ermolaeva, V. V., Kolesnikova, L. I., Molchanova, L. V., Kosovanova, L. V.: Peroxidation of Lipids in Blood Serum of Patients with Gastric and Duodenal Ulcer
- Bannikov, G. A., Tchipyshcheva, T. A.: The Preparation of Monospecific Antibodies Against A-Protein and Immunological Study on Distribution of This Protein in Normal and Tumor Tissues
- Peschansky, V. S., Libinson, G. S.: Physico-Chemical Aspects of Mineralization of Epiphyseal Cartilage in Enchondrial Osteogenesis
- Platonova, T. K., Petrenko, O. A.: Characterization of Human Plasminogen Activator and of the Blood Plasma Fraction with Fibrinolytic Activity, Enriched with Plasminogen
- Volzhina - Atabegova, N. G.: Activity of Brain Oxidative Enzymes of Krebs Cycle in Hypothermia
- Safrazbekyan, R. R., Sukasyan, R. S., Arzanuntz, E. M.: The Role of Initial Activity of Monoamine Oxidase in Development of Activating or Inhibitory Effects of Indolyl Hydrazides
- Astvatsatur'yan, A. T., Stavitsky, I. M., Gubareva, A. E., Alimova, E. K.: Biosynthesis of Arachidonic Acid in Ras Small Intestine
- Muzhichenko, A. V., Nikol'skaya, O. N., Khardina, G. A.: Hepatotoxicity of Lipid Components from Lipopolysaccharides of Salmonella Typhi
- Kholmina, G. V., Gorkin, V. Z.: On the Oxidation of Fatty-Aromatic Aldehydes in Liver Tissue
- Goroshinskaya, I. A.: Activity of A and B monoamine Oxidases in Hyperbaric Oxygenation
- Barabash, R. D., Gukovich, E. K., Berezovskaya, Z. V., Varava, G. N., Levitsky, A. P., Djachen-

пероксидазы в патогенезе пародон- тоза	333	ko, Yu. V.: The Role of Peroxidase in Pathogenesis of Periodontal Disease
Кузнецов А. С. Комплексы апо-В содержащих липопротеидов с гликозаминогликанами с плот- ностью выше 1,063 г/мл в аорте человека	343	Kuznetsov, A. S.: Complexes of apo-B Containing Lipoproteins and Glycosaminoglycans with a Density Above 1.063 g/ml from Human Aorta
Стай Е. Я., Черников М. П. К вопросу о физиологической ак- тивности каппа-казеинового гли- комакропептида	348	Stan, E. Ya., Chernikov, M. P.: On the Physiological Activity of k-Casein Glycomacropeptide
Методы биохимических исследований		Methods of Biochemical Investigations
Киреев М. М., Конвай В. Д. Полумикрометод определения кис- лотоэкстрагируемых нуклеотидов в органах мелких лабораторных животных	352	Kireev, M. M., Konvay, V. D.: A Semi-Micromethod for Estimation of Acid Extractable Nucleotides in Tissues of Small Laboratory Animals
Бездробный Ю. В., Евдо- кимова Н. Ю. Выделение плаз- матических мембран жировых кле- ток без применения коллагеназы	354	Bezdrobny, Yu. V., Evdoki- mova, N. Yu.: Isolation of Plas- matic Membranes of Fatty Cells With- out the use of Collagenase
Мхеидзе М. О., Пекар- ская Н. А., Шапошни- ков А. М. Экспресс-метод вы- явления мутантных форм холин- эстеразы сыворотки крови чело- века	359	Mkheidze, M. O., Peкар- skaya, N. A., Shaposhni- kov, A. M.: An Express Method for Evaluation of the Mutant Forms of Cholinesterase in Human Blood Serum

Рецензии

Book Reviews

Техн. редактор *И. К. Арибжанова*

Корректор *Т. И. Антонова*

Сдано в набор 06.03.79.	Подписано в печать 16.04.79.	Формат 70×108/16	Бумага тип. № 1
Гарнитура литературная	Печать высокая Печ. л. 9,0	усл. печ. л. 12,60	Уч.-изд. л. 13,55
	Тираж 2050 Цена 80 коп.	Заказ 621	

Издательство «Медицина». Москва 101838, Петроверигский пер., 6/8.
Чеховский полиграфический комбинат Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области