

Е. Л. Розенфельд

О НАРУШЕНИИ ТРАНСПОРТА ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА КАК ВОЗМОЖНОЙ ПРИЧИНЕ ГЛИКОГЕНОЗА ТИПА IБ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В последние годы описано свыше 10 больных гликогеновой болезнью, которые по клиническим данным и данным биохимических исследований in vivo должны были быть отнесены к больным гликогенозом I типа (дефект глюкозо-6-фосфатазы). Однако при анализе ткани печени этих больных, полученной при биопсии, была выявлена нормальная активность глюкозо-6-фосфатазы. Было предложено отнести заболевание такого рода к гликогенозу типа IБ. Высказывается предположение, согласно которому несоответствие между результатами биохимических исследований in vitro и in vivo вызвано отсутствием в печени этих больных специфической пермеазы, которая переносит глюкозо-6-фосфат из цитозоля на внутреннюю поверхность мембран цитоплазматической сети, где локализована глюкозо-6-фосфатаза.

Гликогеноз I типа, или болезнь Гирке, является одним из наиболее изученных заболеваний, относящихся к так называемой гликогеновой болезни.

Возникновение патологических процессов при этом заболевании, наследуемом по аутосомно-рецессивному типу, вызвано резким снижением или полным отсутствием активности глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Ф-азы) в печени, слизистой оболочке кишечника, а иногда и в почках, а также значительным накоплением гликогена в печени больных. Признаки заболевания проявляются обычно с первых лет жизни. Характерной особенностью этой патологии является внешний вид детей: маленький рост, непропорционально худые конечности, «кукольное» лицо, гепатомегалия. Кроме характерных внешних признаков, у больных наблюдаются резкая гипогликемия и высокое содержание лактата в крови патологическое. Это вызвано тем, что в отсутствие Г-6-Ф-азы не происходит образования глюкозы из Г-6-Ф, а последний накапливается и превращается в молочную кислоту, что и является причиной гипогликемии и гиперлактатемии. Избыток Г-6-Ф активирует гликогенсинтетазу D, что приводит к накоплению в клетках печени гликогена. Избыток лактата также оказывает активирующее действие на гликогенсинтетазу и также способствует образованию гликогена. Поэтому накопление гликогена (нормального по структуре) при гликогенозе I типа является, по-видимому, следствием усиленного синтеза, а не снижения распада гликогена, что характерно для многих других типов гликогенозов. Кроме гликогена, в гепатоцитах больных накапливается большое количество липидов.

Нагрузки сахарами и гормонами (адреналином и глюкагоном) приводят к характерным изменениям в содержании глюкозы и лактата в крови больных, поэтому проведение этих нагрузок используется для дифференциальной диагностики гликогеновой болезни. При гликогенозе I типа нагрузка глюкозой вызывает снижение содержания лактата в крови, так как избыток глюкозы алиментарного происхождения тормозит фосфолиз гликогена, а содержание глюкозы в крови достигает исходного уровня лишь через $2\frac{1}{2}$ —3 ч. При введении адреналина или глюкагона содержание глюкозы в крови больных не увеличивается, несмотря на то что эти

гормоны активируют фосфоролиз гликогена. Поэтому гликемические кривые у больных плоские, а содержание лактата (и без того высокое) повышается в еще большей степени, что приводит к усилению метаболического ацидоза. Эти данные в сопоставлении с данными об отсутствии или резком снижении активности Г-6-Ф-азы и аномальном содержании гликогена в печени дают обычно основание для постановки диагноза гликогеноза I типа однозначно. Оказалось, однако, что наряду с типичными случаями гликогеноза I типа встречаются такие, при которых, несмотря на клиническую картину и данные биохимических исследований *in vivo*, типичные для этого заболевания, дефект в активности Г-6-Ф-азы не обнаруживается. Впервые подобный случай описан в 1961 г. [11]. Изучая больных гликогенозами, авторы поставили диагноз гликогеноза типа Iб больным, однако у 1 из них (мальчика 10 мес) активность Г-6-Ф-азы в печени была в пределах нормы. Между тем у него были резко выраженная гипогликемия (10—15 мг на 100 мл натощак), гиперлактатемия, ацидоз, плоские гликемические кривые и снижение содержания лактата в крови при нагрузке глюкозой. У остальных 5 детей Г-6-Ф-аза в ткани печени либо полностью отсутствовала, либо составляла менее 10% от нормы. У данного больного двое старших сибсов умерли в детстве. У обоих была гепатомегалия, а одному из них был поставлен диагноз гликогеноза.

Сходный случай был описан в 1964 г. [12]. Авторы обнаружили клинические признаки гликогеноза I типа с первых же месяцев жизни девочки, умершей в 26 мес. У этого ребенка наблюдались задержка роста и умственная отсталость (вероятно, из-за резкой гипогликемии, наблюдавшейся уже в первые дни жизни), гепатомегалия, гиперлипемия и кетонурия. При введении адреналина содержание глюкозы в крови не увеличивалось, а лактата повышалось до 192 мг на 100 мл. При нагрузке галактозой также была выявлена типичная для этого заболевания картина. Однако и в этом случае, так же как и в первом, энзиматический дефект при анализе ткани печени обнаружен не был. Третий случай был описан в 1967 г. итальянскими исследователями [13]. У мальчика 13 лет с типичной картиной гликогеноза I типа в ткани печени, полученной при биопсии, было обнаружено 9,5% гликогена, а активность Г-6-Ф-азы составляла 6 ед. на 1 г ткани (при норме от 2 до 10 ед/г). У второго обследованного ребенка с диагнозом гликогеноза I типа активность Г-6-Ф-азы в ткани печени отсутствовала. Эти авторы пришли к заключению, что у первого ребенка имеет место гликогеноз типа Iб. В 1968 г. был описан [14] еще один больной гликогенозом типа Iб, т. е. с «функциональным» дефектом Г-6-Ф-азы. Авторы, описавшие этот случай, высказали предположение, что при этом заболевании изменяется конформация молекул фермента, что приводит к его связыванию в клетке. При разрушении ткани *in vitro* фермент освобождается и поэтому может быть обнаружен. В 1971 г. [15] было обследовано 23 больных с печеночной формой гликогенозов. У 3 больных не было найдено ферментативного дефекта. Между тем у них была типичная картина болезни Гирке — резкая гипогликемия, гиперлактатемия, гиперурикемия. По всем признакам эти больные могли бы также быть отнесены к группе больных гликогенозом типа Iб. В 1972 г. во Франции [16] был описан больной, которому по клиническим данным и данным нагрузочных проб мог быть поставлен диагноз гликогеноза I типа, однако ферментный дефект у этого больного не был обнаружен. Попытки объяснить этот факт тем, что в крови больного имелся ингибитор, тормозящий активность Г-6-Ф-азы *in vivo* и являющийся причиной того, что фермент «функционально» неактивен, кажутся малоубедительными. Вторичная биопсия ребенку в возрасте 7½ мес также не позволила обнаружить энзиматический дефект [17]. Следующий случай гликогеноза типа Iб был описан Moses [8, 9]. Этот автор для выяснения причин несоответствия между данными, получаемыми им *in vivo* и *in vitro*, применил метод [10] с использованием меченой ³H- и ¹⁴C-глюкозы, но не получил ожидаемых результатов.

В 1977 г. в ГДР были опубликованы данные по обследованию 3 больных гликогенозом I типа [11]. У 2 из них активность Г-6-Ф-азы в гомогенате печени была резко снижена и составляла не более 4—7% от активности этого фермента в норме. У третьего больного активность Г-6-Ф-азы была нормальной, так же как и активность других ферментов обмена гликогена. Полагая, что у этого ребенка имеется «функциональный» дефект Г-6-Ф-азы, авторы обсуждают вопрос о зависимости активности фермента в клетках от ряда факторов — присутствия ингибиторов, активаторов, кофакторов, а также от возможных структурных модификаций молекул фермента. В связи с тем что Г-6-Ф-аза связана с мембраной цитоплазматической сети и тормозится фосфолипидами, они предположили, что в данном случае речь может идти об изменении структуры фосфолипидов мембран. Поэтому, по их мнению, для установления диагноза типа гликогеноза Ia или Ib необходимо, помимо исследований активности ферментов в тканях, проводить функциональные исследования.

В 1978 г. в Англии и в СССР появились две новые работы с описанием случаев гликогеноза типа Ib. Английские авторы [12] обследовали ребенка начиная с 11-недельного возраста до 30 мес. У него наблюдались все признаки, характерные для гликогеноза I типа. В моче больного, кроме значительных количеств молочной кислоты, была обнаружена 2-оксиглутаровая кислота. В ткани печени, полученной при биопсии, было свыше 13% гликогена, а активность Г-6-Ф-азы, амило-1,6-глюкозидазы, фосфорилазы и фруктозо-1,6-дифосфатазы была нормальной. Авторы высказали ряд предположений, которые могли бы объяснить полученные ими результаты.

1. Мутация фермента вызывает такие изменения структуры белка, которые снижают его сродство к субстрату в условиях *in vivo*, но не *in vitro*, когда реакция протекает в условиях насыщения фермента субстратом.

2. В связи с тем что Г-6-Ф-аза является гликопротеидом, прочно связанная с мембраной эндоплазматической сети, изменение структуры фермента изменяет, возможно, характер его связывания с мембраной и ориентацию каталитического участка.

3. Изменения могут касаться структуры самой мембраны. Любое из этих изменений должно было бы сказываться на каталитических свойствах фермента *in vivo* и не отражаться на них в условиях *in vitro*.

В настоящее время, однако, нет данных, которые служили бы подтверждением той или иной из высказанных гипотез.

Нами было обследовано 2 больных 4¹/₂ и 6¹/₂ лет с клиническими признаками гликогеноза I типа — гепатомегалией, гипогликемией и гиперлактатемией натошак [13]. У обоих детей признаки заболевания проявлялись с 6 мес. Гликемические и лактатемические кривые после нагрузки глюкозой и адреналином были типичны для гликогеноза I типа. В моче больных было обнаружено значительное количество лактата — 2280 мг за 24 ч у одного и 484 мг за 24 ч у другого при норме, не превышающей 60 мг за 24 ч. При исследовании ткани печени, полученной при биопсии, были обнаружены у обоих больных аномальное содержание гликогена и нормальная активность следующих ферментов — Г-6-Ф-азы, фосфорилазы, амило-1,6-глюкозидазы, фосфоглюкомутаза, фосфоглюкозоизомеразы, фруктозо-1,6-дифосфатазы и кислой α -глюкозидазы. На основании данных, полученных с помощью нагрузочных проб с глюкозой и адреналином, биохимического изучения ткани печени и определения содержания молочной кислоты в моче, больным был поставлен диагноз гликогеноза типа Ib. Диета с заменой сахарозы на глюкозу и одновременное назначение глюкозы ночью в три приема привели к улучшению состояния больных, снижению содержания лактата в моче до нормы и увеличению в крови содержания глюкозы.

Нам кажется наиболее вероятным интерпретировать наши результаты и результаты других авторов о несоответствии между данными, полученными

ми *in vivo* и *in vitro*, в свете исследований авторов [14, 15], которые показали, что Г-6-Ф-аза является двухкомпонентной системой, состоящей из пермеазы, переносящей Г-6-Ф из цитозоля в цистерны цитоплазматической сети, и из фосфогидролазы, расщепляющей Г-6-Ф. Пермеаза высокоспецифична, и переноса других фосфатов сахаров, например маннозо-6-фосфата, таким путем не происходит [16]. Перенос Г-6-Ф осуществляется не простой адсорбцией, а активным транспортом. Таким образом, образование глюкозы в печени из Г-6-Ф происходит в два этапа: первый из них заключается в переносе Г-6-Ф из цитозоля через мембрану цитоплазматической сети на внутреннюю поверхность последней, где локализована фосфогидролаза, с помощью специфической пермеазы. Лишь после этого Г-6-Ф может подвергаться энзиматическому гидролизу. По-видимому, при гликогенозе типа Ib отсутствует пермеаза, поэтому *in vivo* образования глюкозы из Г-6-Ф у больных не возникает из-за разобщения фосфогидролазы и субстрата, что вызывает явления, характерные для гликогеноза типа Ib. В размельченной ткани, когда устранена преграда между ферментом и субстратом, происходит нормальное расщепление Г-6-Ф. Аналогичная картина возможна и для других мембраносвязанных ферментов, разобщенных с субстратом.

Нарушения транспортных систем могут быть причиной различных врожденных пороков обмена, вызванных дефектами мембраносвязанных систем ферментов. Известно, например, что активность УДФ-глюкуропилтрансферазы печени, связанной с мембранами цитоплазматической сети, зависит от пермеазы, которая переносит УДФ-глюкуроновую кислоту в цистерны цитоплазматической сети [17]. УДФ, УТФ и УДФ-глюкоза, тормозящие фермент в разрушенных микросомах, не оказывают влияния на фермент в клетке, так как не доставляются специфической пермеазой — УДФ-глюкуропилтрансферазой — к ферменту.

Роль подобных специфических пермеаз должна учитываться при изучении действия ферментов в клетке.

Когда статья была сдана в печать, наше предположение было подтверждено работами японских исследователей, которые также наблюдали ребенка, больного гликогенозом типа Ib. В ткани печени, полученной с помощью игольчатой биопсии, они обнаружили нормальную активность глюкозо-6-фосфатазы. Однако, когда несколько лет спустя ребенок был оперирован и полученная ткань печени была гомогенизирована в растворе 0,25 М сахарозы, то активность фермента в этом гомогенате была резко снижена и могла быть обнаружена только после его обработки детергентом. Полученные данные подтвердили предположение, что активность глюкозо-6-фосфатазы при гликогенозе типа Ib не меняется, а дефект касается пермеазы, из-за отсутствия которой глюкозо-6-фосфат цитозоля разобщен с расщепляющим его ферментом [18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Sokal J. E., Lowe C. U., Sarcione E. J. et al. — J. clin. Invest., 1961, v. 40, p. 364—374. — 2. Briggs J. N., Haworth J. C. — Am. J. Med., 1961, v. 36, p. 443—449. — 3. Marchi A. G., Berio A., Bertolotti E. et al. — Minerva pediat., 1967, v. 19, p. 682—688. — 4. Senior B., Loridan L. — New Engl. J. Med., 1968, v. 279, p. 958—965. — 5. Spencer-Peet J., Norman M. E., Lake B. D. et al. — Quart. J. Med. New Ser., 1971, v. 40, p. 95—114. — 6. Badoual J., Lestrade H., Tichet J. et al. — Ann. Pédiat., 1972, v. 19, p. 507—514. — 7. Grenet P., Badoual J., Lestrade H. et al. — Ibid., p. 499—506. — 8. Moses S. W. — Israel J. med. Sci., 1973, v. 9, p. 1106. — 9. Moses S. W. — In: Purine Metabolism in Man (International Symposium). New York, 1974, p. 353—359. — 10. Van Hooff F., Hue L., De Barsy Th. et al. — Biochimie, 1972, v. 54, p. 745—751. — 11. Buhrdehl P., Zimmermann G., Theile H. et al. — Kinderärztl. Praxis, 1977, Bd 45, S. 211—218. — 12. Chalmers R. A., Ryman B. E., Wallis W. E. — Acta paediat. scand., 1978, v. 67, p. 201—207. — 13. Rosenfeld E. L., Chibiso V. T. V., Chistova L. V. et al. — Clin. chim. Acta, 1978, v. 86, c. 295—299. — 14. Ari-

on W. Y., Lange A. J., Ballas L. M. — J. biol. Chem., 1976, v. 251, p. 6784—6790. — 15. Ballas L. M., Arion W. J. — Ibid., 1977, v. 252, p. 8512—8518. — 16. Nilson O. S., Arion W. J., Depierre J. V. et al. — Europ. J. Biochem., 1978, v. 82, p. 627—634. — 17. Berry C., Hallinan T. — Biochem. Soc. Trans., 1976, v. 4, p. 650—653. — 18. Narisawa K., Ig arashi J., Otomo K. et al. — Bioch. Biop. Res. Comm., 1978, v. 83, p. 1360—1364.

Поступила 10/VII 1978 .

ON THE IMPAIRMENT OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE TRANSPORT AS A PROBABLE CAUSE OF GLYCOGENOSIS OF THE Ib TYPE

E. L. Rosenfeld

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

More than ten patients with glycogen-storage disease, which were classified as patients with glycogenosis of the I type—deficiency in glucose-6-phosphatase) on the basis of clinical data and biochemical analyses in vivo, were detected within the last few years. But activity of glucose-6-phosphatase was found to be normal in biopsy of samples of the liver tissue obtained from these patients. This disease was termed as glycogenosis of the Ib type. A hypothesis is advanced, according to which the discrepancy in data on biochemical study of the patients in vivo and in vitro is due to absence of a specific permease in liver tissue, which transfers glucose-6-phosphate from cytosol onto the inner-surface of membranes of cytoplasmic network, where glucose-6-phosphatase is located.

УДК 612.12.018.014.46:546.28

К. Н. Веремеенко, Н. Ф. Погорелая

ПРИМЕНЕНИЕ АЭРОСИЛОВ ПРИ АКТИВАЦИИ ПРЕКАЛЛИКРЕИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ

Лаборатория биохимии Киевского научно-исследовательского института отоларингологии Министерства здравоохранения УССР, Киев

В предыдущих исследованиях [1, 2] было показано, что при обработке плазмы крови человека органическими кремнеземами — аэросилами — образуется протеиназа, расщепляющая протамин. Активируемый фермент неощущает плазмину и тромбину и проявляет специфическую кининогеназную активность, т. е. обладает свойствами калликреинов плазмы [2].

Механизм контактной активации прекалликреина с помощью аэросилов и других чужеродных частиц изучен недостаточно. Известно, однако, что обязательным условием этой активации является наличие в плазме фактора Хагемана — XII фактора свертывания крови [3—5]. Установлено, что фактор Хагемана, находящийся в плазме в неактивной форме, превращается в активную форму, которая и катализирует образование калликреина из неактивного предшественника — прекалликреина [6].

Существует мнение, что активация фактора Хагемана происходит под влиянием отрицательно заряженных поверхностей силикатов, а в условиях организма роль активатора играют карбоксильные анионы поверхности коллагена [7, 8]. Согласно данным других авторов [9—11], активация фактора Хагемана осуществляется при взаимодействии как с положительными, так и с отрицательными зарядами чужеродной поверхности.

В настоящей работе изучали механизмы превращения прекалликреина в калликреин в условиях контактной активации плазмы с использованием аэросилов — органических кремнезёмов, которые характеризуются определенными физико-химическими константами и несут на поверхностях функциональные химические группы с кислыми и щелочными свойствами.

Методика

Активность контактного калликреина определяли по методу Веремеенко и соавт. [12], используя в качестве субстрата протамин. Активность фермента выражали в единицах оптической плотности при 508 нм. Активаторами являлись каолин и два вида высокодисперсных непористых препарата кремнезема — аминэтоксияэросил и карбоксиаэросил. Препараты аэросилов синтезированы в Институте физической химии АН УССР на основе исходного аэросила с удельной поверхностью 300 м²/г: аминэтоксияэросил содержал аминогруппы (0,58 ммоль/г), несущие положительный заряд, поверхность карбоксиаэросила приобретала отрицательный заряд благодаря наличию карбоксильных групп (0,33 ммоль/г) [13].

В опыте использовали 0,5% аэросиловый гель и 0,5% суспензию каолина, приготовленные на 0,05 М медианальном буфере pH 7,6. Источником прекалликреина слу-

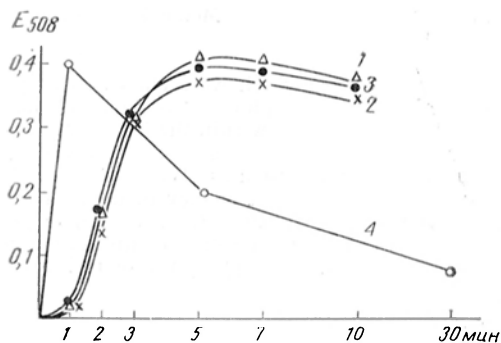


Рис. 1. Активация прекалликреина плазмой аэросилами и каолином.

Здесь и на рис. 2 и 3: по оси абсцисс — время активации (в мин), по оси ординат — оптическая плотность при 508 нм. Температура 10°C. 1 — карбоксиаэросил, 2 — аминэтоксияэросил, 3 — каолин. Температура 25°C; 4 — каолин.

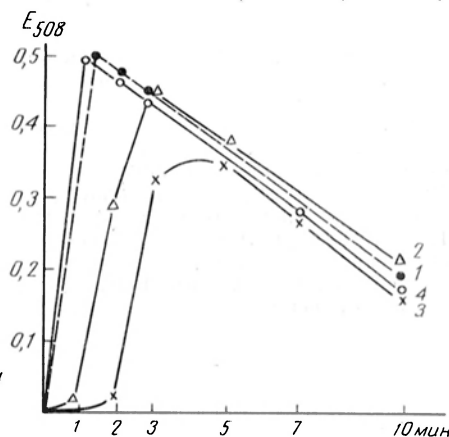


Рис. 2. Действие белков на активацию прекалликреина плазмой карбоксиаэросилом.

1 — дезоксирибонуклеаза; 2 — рибонуклеаза; 3 — лизоцим; 4 — без добавления белков.

жила цитратная плазма крови человека, полученная центрифугированием смеси 4,5 мл свежей крови с 0,5 мл 3,8% раствора антикоагулянта при 800 g в течение 15 мин. Забор крови и постановку опыта проводили в полиэтиленовой посуде. Каждое исследование состояло из опытов, проведенных на трех различных образцах свежей плазмы.

В качестве ингибиторов активации прекалликреина использовали белковые вещества и полиамины: лизоцим Олайнского завода химических реактивов, рибонуклеазу фирмы «Reanal», препараты хлоридов полиаминов фирмы «Serva» — спермин, спермидин, путресцин. Ингибиторы растворяли в 0,05 М медианальном буфере pH 7,6 в концентрации 10 мг/мл. В опытной пробе к 1 мл плазмы добавляли 0,2 мл ингибитора (2 мг), выдерживая 5 мин при 10 или 25°C, а затем добавляли аэросил. В различные промежутки времени (1—10 мин) отбирали аликвоты по 0,2 мл и определяли активность фермента [12].

Результаты и обсуждение

Действие положительно и отрицательно заряженных аэросилов. Активация прекалликреина при разной температуре.

На рис. 1 представлены кривые активации прекалликреина амино- и карбоксиаэросилами. Гранулы первых несут на своей поверхности положительные, вторых — отрицательные электрические заряды при нейтральной реакции среды. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии существенных различий в активирующем действии между амино- и карбоксиаэросилами. Знак заряда поверхности гранул, очевидно, не является решающим при контактной активации фактора Хагемана, предшествующей превращению прекалликреина в калликреин. Очевидно, что адсорбция этого фактора каталитически активными поверхностями не основана на притяжении между общим зарядом белковой молекулы и зарядом поверх-

ности. Можно полагать, что основой контактной активации являются взаимодействия неионных полярных гидрофильных групп (активирующим действием обладают гидрофильные, но не гидрофобные аэросилы) [11]. Благодаря взаимодействию полярных групп может образовываться комплекс силикат — фактор Хагемана, в котором последний деформируется и активируется. Пока приходится ограничиться констатацией того факта, что для активации фактора Хагемана требуется жесткая структура с гидрофильной поверхностью.

Данные, представленные на рис. 1, показывают, что при 25°C активация фактора Хагемана аэросилом протекает настолько быстро, что проследить ее ход невозможно: максимальная активация достигается за первую минуту опыта и обнаруживается при первом же определении фермента. При 10°C активация замедлена в достаточной степени для того, чтобы наблюдать ее течение во времени. Поэтому основные опыты — сравнение аэросилов между собой и с каолином — проведены при 10°C. Понижение температуры от комнатной до 10°C замедляет не только процесс активации, но и реакцию инактивации образовавшегося калликреина ингибиторами плазмы (см. рис. 1).

Максимум, достигаемый при активации прекалликреина, не зависит от температуры (см. рис. 1). Остается невыясненным, какой из двух процессов более чувствителен к температуре и лимитирует общую скорость процесса — активация фактора Хагемана на поверхности кремнезема или превращение прекалликреина в калликреин. Этот вопрос представляет интерес, и мы надеемся в будущем его экспериментально решить.

Действие основных белков и полиаминов на контактную активацию.

При изучении природы контактной активации нужны сведения не только о веществах, способных вызывать активационный переход, но и о веществах со свойствами ингибиторов, в особенности специфических ингибиторов. В литературе имеются указания на то, что основные белки тормозят контактную активацию фактора Хагемана [15]. Мы проверили это положение на двух основных белках — лизоциме и рибонуклеазе. Белки преинкубировали с плазмой крови в течение 5 мин, после чего добавляли карбоксиаэросил и в различные промежутки времени определяли активность фермента.

На рис. 2 видно, что рибонуклеаза и лизоцим задерживают активацию плазменного прекалликреина; максимум активации обнаружен на 3—5-й минуте вместо 1-й минуты в контроле. Кроме того, прирост активности не достигает уровня, характерного для опытов, в которых ингибитор не добавлялся. Лизоцим, имеющий более щелочные свойства (pI 10,1), оказывает более выраженное ингибиторное действие по сравнению с рибонуклеазой, pI которой находится при pH 8,0. Полного угнетения активации не наблюдается, происходит лишь ее задержка. Точнее, основные белки задерживают начало активации, создавая индукционный период; параллельно снижается и максимум достигаемой активности. Дезоксирибонуклеаза (pI 5,0) — белок, имеющий свойства слабой кислоты, на активацию прекалликреина влияния не оказывал.

После установления факта торможения контактной активации основными белками возник вопрос, не свойствен ли аналогичный эффект более простым органическим основаниям. Проведенные нами исследования показали, что некоторые из них являются эффективными ингибиторами, другие инертны. На рис. 3 приведены результаты сравнения трех веществ — путресцина ($\text{NH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2$), спермидина ($\text{NH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2$) и спермина ($\text{NH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2$).

Путресцин (диаминобутан) оказался совершенно неактивным. Спермидин (несколько более сложное основание) дал слабый эффект торможения, сходный с эффектом рибонуклеазы. Спермин (еще более сложный диамин) проявил себя как очень мощный ингибитор. В условиях наших опытов он полностью подавляет контактную активацию. Все три вещества были использованы в одинаковых весовых концентрациях, следовательно, молярная концентрация была наибольшей для путресцина и наименьшей для спермина.

Различие эффективности спермидина и спермина привлекает особое внимание. Эти вещества имеют общий тип строения. По сравнению со спер-

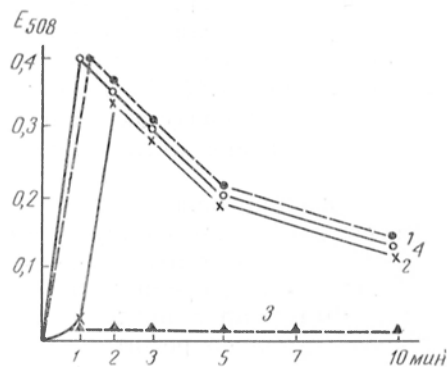


Рис. 3. Влияние полиаминов на активацию прекалликреина плазмы карбоксиаэросилом.

1 — путресцин; 2 — спермидин; 3 — спермин; 4 — без добавления полиаминов.

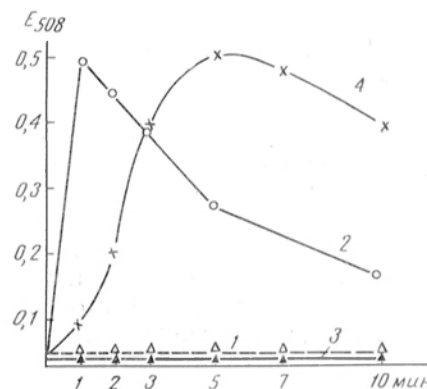


Рис. 4. Торможение активации плазменного прекалликреина карбоксиаэросилом, инкубированным со спермином.

Температура 25°C: 1 — аэросил + спермин, 2 — аэросил. Температура 10°C: 3 — аэросил + спермин, 4 — аэросил.

мидином молекула спермина усложнена повторением последовательности групп $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$. Это делает молекулу симметричной по поперечной оси, проходящей между атомами 7 и 8 линейной последовательности атомов С и N. Таким образом, сравнительно незначительное усложнение молекулы без введения каких-либо новых функциональных химических групп превращает слабый ингибитор — спермидин — в чрезвычайно активный агент — спермин. Тот факт, что данное преобразование делает молекулу сильным специфическим ингибитором, показывает, что эта форма «узнает» и блокирует определенную структуру, существенную для контактной активации фактора Хагемана. Из участников этого процесса — фактор Хагемана, прекалликреин и кремнезем — наиболее вероятной мишенью ингибитора спермина является белок фактора Хагемана.

Блокирующее действие спермина проявляется очень быстро. Предварительное выдерживание плазмы со спермином в течение 1 мин дает столь же полную остановку контактной активации, как и 25-минутное выдерживание.

В специальных опытах карбоксиаэросил инкубировали со спермином в течение 15 мин, а затем смесь добавляли к плазме. Опыты показали (рис. 4), что смесь карбоксиаэросил — спермин полностью лишена активирующей способности. Этот результат можно было бы отнести за счет инактивации спермином аэросила, но более вероятное объяснение — быстрая реакция между фактором Хагемана и спермином.

В контрольных опытах проверено отсутствие действия основных белков и полиаминов на уже активированный фермент. Исследуемые вещества добавляли после предварительного контакта плазмы с аэросилом. Ни в одном из этих опытов не отмечено задержки протаминрасщепляющего действия фермента.

Возникает интересный вопрос: какие особенности строения спермина определяют активность этого вещества? Вероятно, это сочетание групп —NH₂ и —NH, разделенных определенным числом —CH₂—. Для решения этого вопроса требуются дальнейшие работы, в особенности с применением специально синтезированных аналогов спермина.

Авторы выражают признательность акад. АН УССР В. А. Белицеру за ценные советы при выполнении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мегедь Н. Ф., Веремієнко К. М., Павлов В. В. — Укр. біохім. ж., 1976, т. 48, с. 370. — 2. Веремієнко К. М., Кизим А. И., Лосицкая В. М. — Вопр. мед. химии, 1977, т. 23, с. 391. — 3. Cochran C. G., Rewak S. D., Wuerper K. D. — J. exp. Med., 1973, v. 138, p. 1564. — 4. Griffin J. H., Cochran C. G. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 2554. — 5. Mandle R. J., Colman R. W., Kaplan A. P. — Ibid., p. 4179. — 6. Colman R. W. — New Engl. J. Med., 1974, v. 291, p. 509. — 7. Webster M. E. — Fed. Proc., 1968, v. 27, p. 84. — 8. Hargre P. — J. clin. Invest., 1972, v. 51, p. 1813. — 9. Eisen V. — Proc. roy. Soc. B., 1969, v. 173, p. 351. — 10. Зубаиров Д. М., Асадуллина З. З., Попова Л. Г. — Пробл. гематол., 1971, № 10, с. 49. — 11. Зубаиров Д. М., Попова Л. Г., Ахметшина М. Х. — Укр. біохім. ж., 1973, т. 45, с. 86. — 12. Веремієнко К. М., Волохонская Л. И., Кизим А. И. и др. — Лабор. дело, 1975, № 1, с. 9. — 13. Чуйко А. П. — Заболевания органов дыхания и мероприятия по их снижению у детей раннего возраста. Автореф. дис. канд. Киев, 1972. — 14. Асадуллина З. З., Попова Л. Г. — Вопр. мед. химии, 1976, т. 22, с. 356. — 15. Nossel H. L., Rubin H., Drillings M. et al. — J. clin. Invest., 1968, v. 47, p. 1172.

Поступила 26/VII 1978 г.

USE OF AIRSILES IN ACTIVATION OF PREKALLIKREIN FROM BLOOD PLASMA

K. N. Veremeenko, N. F. Pogorelaya

Laboratory of Biochemistry, Institute of Otorhinolaryngology, Kiev

Activation of prekallikrein from human blood plasma was studied using silica (airsiles), which carried functional groups with acidic and alkaline properties on the surface. Prekallikrein was similarly activated by amino- and carboxyairsiles, possessing positive and negative electric charges, respectively, at neutral pH value in a medium. Lysozyme, ribonuclease and spermidine inhibited partially the prekallikrein activation; spermine inhibited it completely.

УДК 616.63-008.6-085.272.2:547.814.5]-07:616.153.49

В. Е. Соколова, Л. А. Любарцева

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ НА НЕКОТОРЫЕ СТОРОНЫ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УРЕМИИ

Лаборатория экспериментальной фармакологии Харьковского научно-исследовательского химико-фармацевтического института

Экспериментальными исследованиями установлено, что ряд флавоноидных препаратов оказывает активное влияние на азотистый обмен [1, 2]. Это послужило основанием для использования их в качестве гипоазотемических средств при почечной недостаточности [3]. Одним из характерных и наиболее ранних проявлений уремической интоксикации являются функциональные расстройства нервной системы [1]. В связи с этим, а также с данными о важной роли печени в обезвреживании аммиака изучение воздействия лекарственных веществ на нарушенный при уремии азотистый обмен представляет большой интерес.

Мы изучали влияние робинина (кемпферол-7-рамно-3-робинобиозид) и гиперина (кверцетин-3-галактозид) на систему превращений аммиака в головном мозге крыс при уремической интоксикации, а также на процесс мочевинообразования в печени.

Методика

Опыты проведены на 68 беспородных белых крысах обоего пола массой 220—280 г. Уремию у животных вызывали двусторонней нефрэктомией. Флавоноиды вводили внутривентриально в дозе 100 мг/кг (по 50 мг/кг 2 раза в день) в течение 5 дней до нефрэктомии и во все последующие дни до наступления коматозного состояния. Обмен аммиака в мозге крыс и процесс мочевинообразования в печени изучали после наступления уремической комы (спустя 3 сут после нефрэктомии). В качестве показателей обмена аммиака в головном мозге крыс исследовали содержание свободного аммиака, глутамина и амидного азота белков. Животных быстро декапитировали

Влияние робинина и гиперина на превращение аммиака в мозге крыс с экспериментальной уремией

Условия опыта	Число крыс	Показатели азотистого обмена, мг на 100 г		
		аммиак	амидный азот глутамина	амидный азот белков
Интактные крысы	12	0,69±0,25***	8,28±0,21***	80,1±3,52***
Крысы после нефрэктомии (контроль)	8	1,43±0,034	10,6±0,26	60,4±1,01
Введение робинина	9	1,04±0,064***	12,1±0,17***	67,9±1,55***
Введение гиперина	8	1,12±0,037***	11,4±0,21*	66,4±1,55**

Примечание. Одна звездочка — $P < 0,05$, две звездочки — $P < 0,01$, три звездочки — $P < 0,001$. P дано по сравнению с контролем.

и немедленно погружали в сосуд с жидким азотом. Замороженный мозг извлекали, тщательно измельчали до тонкого порошка, взвешивали и помещали в охлажденную 5% ТХУ. Белки отделяли центрифугированием и в безбелковых экстрактах определяли свободный аммиак и глутамин по методу Селигсон в модификации А. И. Силаковой и соавт. [4]. Амидный азот белков определяли указанным микродиффузионным методом после предварительного гидролиза навески замороженной ткани в 1 н. H_2SO_4 в течение 1 1/2 ч. Пробы окрашивали фенолгипохлоридным реактивом по методу Бруна и соавт. [5]. Полученные результаты выражали в миллиграммах на 100 г влажной ткани.

Процесс мочевинообразования (синтез мочевины и активность аргиназы) изучали в срезах печени крыс после их декапитации. Приготовление и биохимическую обработку срезов производили по методике, описанной Л. Л. Брагинской и Л. И. Геллер [6, 7]. Для конечного определения мочевины в фильтратах использовали уреазный метод Конвея в модификации А. Г. Гинецинского [8]. Синтез мочевины и активность аргиназы выражали в миллимолях аммиака на 1 г влажной ткани печени.

Цифровые данные обрабатывали по общепринятым методам вариационного анализа.

Результаты и обсуждение

Результаты опытов по изучению обмена аммиака в мозге крыс при уремии и после воздействия флавоноидов приведены в таблице.

Как видно из приведенных в таблице данных, содержание свободного аммиака в мозговой ткани при уремической интоксикации более чем в 2 раза ($P < 0,001$) превышает содержание свободного аммиака в мозге интактных крыс. Наряду с этим наблюдается увеличение содержания амидного азота глутамина на 27,4% и снижение амидного азота белков на 24,6%.

В опытах с введением нефрэктомизированным крысам флавоноидов наблюдалось выраженное снижение накопления свободного аммиака в мозговой ткани. Так, содержание аммиака в мозге крыс, получавших робинин, было на 27% ниже, чем у нефрэктомизированных животных, не получавших

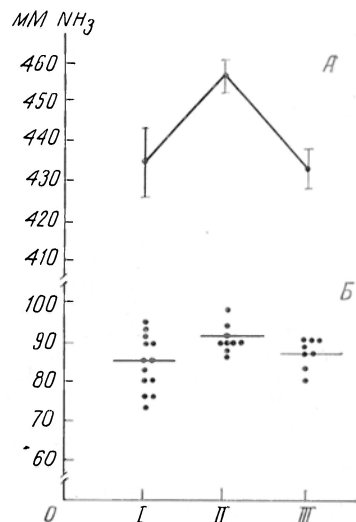
каких-либо препаратов. Под влиянием гиперина содержание свободного аммиака снизилось на 22%. Одновременно с этим содержание амидного азота глутамина в мозге крыс под влиянием робинина и гиперина увеличилось соответственно на 14,5 и 7,6%. Уровень амидного азота белков мозга нефрэктомизированных крыс под влиянием флавоноидов также повысился: после введения робинина на 12,4%, после введения гиперина на 10%.

При изучении процесса мочевинообразования в срезах печени нефрэктомизированных крыс установлено, что при уремии у животных повышается мочевинообразовательная функция печени: синтез мочевины повысился на 7,9 мкмоль NH_3 на 1 г печени, или на 9,3% ($P < 0,02$), активность аргиназы увеличилась на 23 мкмоль NH_3 на 1 г печени, или на 5% ($P < 0,05$). При введении нефрэктомизированным крысам робинина наблюдалось некоторое снижение синтеза мочевины — на 5,4% ($P < 0,05$) и активности аргиназы — на 5,2% ($P < 0,001$). Полученные данные представлены на рисунке.

Проведенные исследования показали, что у крыс при экспериментальной уремии, вызванной двусторонней нефрэктомией, происходит значительное увеличение содержания свободного аммиака в мозге и снижение уровня амидного

Влияние робинина на активность аргиназы (А) и синтез мочевины (Б) в печени крыс после нефрэктомии.

I — интактные крысы; II — после нефрэктомии; III — введение робинина.



азота белков при выраженном увеличении амидного азота глутамина. Эти данные свидетельствуют, что образование аммиака в мозге при уремии происходит в определенной степени за счет усиления дезаминирования белков [9, 10]. Увеличение образования глутамина в мозговой ткани крыс можно рассматривать как результат компенсаторной реакции по связыванию аммиака, образующегося при уремической коме, подобно тому как это происходит и при других коматозных состояниях [11, 12] и отравлении различными ядами [13, 14], причем именно для нервной системы наиболее специфическим путем обезвреживания аммиака является образование глутамина [14].

Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей [15], показавших, что у морских свинок при уремической коме, развившейся после перевязки мочеточников, происходят аналогичные изменения азотистого обмена в мозге.

Помимо изменения обмена аммиака в мозге, нами установлено, что при уремии наблюдается активация мочевинообразовательной функции печени: у нефрэктомизированных крыс повышается синтез мочевины и увеличивается активность аргиназы в срезах печени. Данные литературы [16] свидетельствуют, что у крыс при развившейся уремии наблюдается значительное повышение образования аммиака срезами печени, что свидетельствует об активации процессов дезаминирования при этой патологии. Принимая во внимание общепринятое мнение, что в печени млекопитающих основным путем обезвреживания аммиака является образование мочевины, полученные данные свидетельствуют, что при уремической интоксикации в печени крыс, по-видимому, усиливаются компенсаторные реакции по обезвреживанию образующегося в повышенном количестве аммиака путем образования мочевины.

Установленный факт, что введение нефрэктомизированным крысам флавоноидов вызывает снижение содержания аммиака в мозге при одновременном увеличении содержания амидного азота глутамина, свидетельствует, вероятно, о том, что флавоноиды способны активизировать процесс обезвреживания аммиака в мозге крыс при уремической интоксикации путем образования глутамина. Как было установлено, флавоноиды тормозят также дезаминирование белков в ткани мозга нефрэктомизированных крыс. По-видимому, снижение накопления аммиака в мозговой ткани под влиянием флавоноидов в некоторой степени может быть обусловлено также их способностью тормозить процесс образования аммиака, т. е. определенным антикатаболическим действием [17].

Установленное нами угнетающее действие робинина на аргиназную активность срезов печени крыс находится в соответствии с данными литературы об угнетающем влиянии флавоноидов на активность ряда ферментативных систем организма [18—20].

ЛИТЕРАТУРА

1. Друмлєв Др., Пашов Д. — Научни трудове Висш. ветеринарномедицин-т, 1962, т. 22, с. 229—237. — 2. Соколова В. Е. — В кн.: Фармакология и токсикология. Киев, 1975, вып. 10, с. 62—66. — 3. Лопаткин Н. А., Кучинский И. Н. Лечение острой и хронической почечной недостаточности. М., 1972, с. 160—163. — 4. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. — *Вопр. мед. химии*, 1962, № 5, с. 538—544. — 5. Вгоип R. H., Duda G. D., Kogkes S. et al. — *Arch. Biochem.*, 1957, v. 66, p. 300—309. — 6. Брагинская Л. Л., Геллер Л. И. — В кн.: Гигиена труда и охрана здоровья рабочих в нефтяной и нефтехимической промышленности. Уфа, 1963, т. 2, с. 545—548. — 7. Геллер Л. И. — *Бюлл. exper. биол.*, 1959, № 1, с. 35—38. — 8. Гинцинский А. Г. — *Физиол. ж. СССР*, 1959, № 7, с. 761—766. — 9. Владимирова Е. Е. — В кн.: Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы. 4-я. Тезисы докладов. Тарту, 1966, с. 25—26. — 10. Тяхепыльд Л. Я. — Там же, с. 108. — 11. Козлов Н. Б. Аммиак, его обмен и роль в патологии. М., 1971. — 12. Мережинский М. Ф., Никитина С. М. — В кн.: Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы. 4-я. Тезисы докладов. Тарту, 1966, с. 70—71. — 13. Френкель С. Р., Гордиенко Э. А. — В кн.: Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы. 3-я. Сборник докладов. Ереван, 1963, с. 223—235. — 14. Френкель С. Р., Гордиенко Э. А. — В кн.: Вопросы гигиены труда и профпатологии в химической и машиностроительной промышленности. Харьков, 1966, с. 65—67. — 15. Левина Ц. И., Тяхепыльд Л. Я. — *Вопр. мед. химии*, 1969, № 1, с. 21—24. — 16. Bossehardt R., Thölen H., Enderlin F. — *Experientia (Basel)*, 1957, v. 13, p. 497—499. — 17. Соколова В. Е., Васильченко Е. А., Измайлова И. К. — *Фармакл. и токсикол.*, 1978, № 3, с. 323—327. — 18. Березовская Н. Н. — *Вопр. мед. химии*, 1967, № 2, с. 145—148. — 19. Барабай В. А., Федуров В. В. — *Докл. АН УССР*, 1971, № 1, с. 69—70. — 20. Gugler R., Dengler H. J. — *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1973, Bd 276, S. 223—233.

Поступила 30/VIII 1978 г.

EFFECT OF FLAVONOIDS ON SOME PATTERNS OF NITROGEN METABOLISM IN EXPERIMENTAL UREMIA

V. E. Sokolova, L. A. Lyubartseva

Chemo-Pharmaceutic Institute, Kharkov

Content of free ammonia and glutamine amide nitrogen was increased but content of protein amide nitrogen was decreased in brain tissue after bilateral nephrectomy of rats causing development an experimental uremia; an increased synthesis of urea and activation of arginase were observed in liver tissue. Flavonoids robinine and hyperine decreased the content of free ammonia, increased the content of glutamine amide nitrogen as well as of protein amide nitrogen in rat brain; robinine decreased slightly the urea synthesis and the arginase activity in liver slices of the nephrectomized rats.

Л. А. Кильдема

ИЗМЕНЕНИЯ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА ПИРУВАТКИНАЗЫ ПРИ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Институт экспериментальной и клинической медицины Министерства здравоохранения
Эстонской ССР, Таллин

В клетках печени крыс пируваткиназа (КФ 2.7.1.40) представлена двумя основными типами изоформ — L и M_2 [1, 2]. Из них количественно преобладающий L-тип чувствителен к действию гормональных и алиментарных факторов, а также к аллостерическому влиянию метаболитов [1, 3]. Так, L-тип активируется фруктозо-1,6-дифосфатом и другими фосфорилированными гексозами, а ингибируется АТФ и L-аланином. Активность M_2 -типа относительно стабильна и малочувствительна к действию гормонов [1, 3].

В ткани перевиваемых гепатом установлены глубокие изменения изоферментного состава пируваткиназы [4—6]. Так, в быстрорастущих гепатомах резко уменьшается содержание L-типа фермента, который заменяется M_2 -типом [5—7]. Мало известно, как изменяется активность пируваткиназы в ткани печени при введении канцерогенов и, в частности, в пре-канцерозном периоде. Имеются лишь данные о повышении активности M_2 -типа в печени и гиперпластических узлах, образовавшихся в печени при введении химических канцерогенов [8—10]. Согласно результатам нашей предыдущей работы [11], при гепатоканцерогенезе, индуцированном диэтилнитрозамином (ДЭНА), общая активность пируваткиназы претерпевает заметные изменения: в первичных гепатомах существенно повышается активность M-типа и уменьшается активность L-типа фермента [11]. Установлено также, что кинетические свойства L-типа пируваткиназы, выделенного из гепатом, индуцированных ДЭНА у крыс, заметно отличаются от его свойств в нормальной печени [12]. Резкое повышение активности M-типа установлено также в первичных гепатомах, индуцированных 3'-метил-4-диметиламиноазобензолом [8]. В гепатомах, индуцированных более слабым канцерогеном — N-нитрозоморфилином, повышение активности M_2 -типа оказалось заметно менее выраженным [9].

В настоящей работе исследовали изменения активности изоферментов пируваткиназы в процессе гепатоканцерогенеза, индуцированного ДЭНА у крыс, начиная с начальных этапов введения канцерогена до периода формирования гепатом. В качестве контроля определяли изоферментный состав пируваткиназы в нормальной печени.

М е т о д и к а

Исследования проводили на крысах-самцах Вистар массой 160—200 г. Гепатоканцерогенез вызывали введением с питьевой водой ДЭНА по 2,5 мг на 1 кг массы в сутки 6 раз в течение 8 мес. Исследования проводили с начала введения канцерогена до конца 8-го месяца с интервалами 1 мес.

В конце каждого месяца часть животных декапитировали, извлекали печень и отмывали 0,15 М KCl. Навеску печени гомогенизировали в среде, содержащей 0,01 М трис-HCl-буфер и 0,001 М ЭДТА, 0,15 М KCl pH 7,5. После первичного центрифугирования при 9000 g надосадочную жидкость подвергали центрифугированию при 50 000 g в течение 1 ч.

Растворимую фракцию (цитозоль) ткани печени разделяли на колонке (20 × 150 мм) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 0,01 М трис-HCl-буфером pH 7,5, содержащим 0,25 М сахарозу и 0,001 М ЭДТА. Изоферменты пируваткиназы разделяли в градиенте концентрации KCl (0—0,05 М), собирая фракции элюата по 4 мл, всего 200 мл элюата. Хроматографию проводили при 4—8°C.

Активность пируваткиназы определяли по нарастанию пировиноградной кислоты [1]. Инкубационная смесь содержала 50 мкмоль трис-HCl-буфера pH 7,5, 3 мкмоль фосфоэнолпирувата (гексиламмониевая соль), 12 мкмоль АДФ, 15 мкмоль

MgSO_4 , 100 мкмоль KCl , 0,01 мл исследуемой фракции; общий объем инкубационной смеси 1,0 мл. Инкубацию проводили при 30°C в течение 3 мин. Затем в водяной бане к пробе прибавляли 0,5 мл 0,1% 2,4-динитрофенилгидразина. Спустя 10 мин добавляли 10 мл 2,5% NaOH , а через 10 мин при комнатной температуре измеряли оптическую плотность при 510 нм. Контрольные пробы не содержали АДФ. Стандартные кривые получили при использовании растворов пирувата натрия.

Активность пируваткиназы (как в растворимой фракции, так и в элюате) выражали в микромолях пировиноградной кислоты, образованной за 1 ч инкубации при 30°C на 1 мл фракции элюата или на 1 мг белка (условная единица активности). Содержание белка определяли по Лоури.

Параллельно с биохимическими исследованиями проводили гистологическое изучение печени и опухолей в лаборатории механизмов канцерогенеза. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону и Маллори.

Результаты исследования подвергали вариационно-статистической обработке (t-тест Стьюдента).

Результаты и обсуждение

При хроматографическом фракционировании изоферментов пируваткиназы у контрольных крыс (рис. 1) были получены два пика (фракции) активности. Первый пик (M_2 -тип) не адсорбировался на ДЭАЭ-целлюлозе

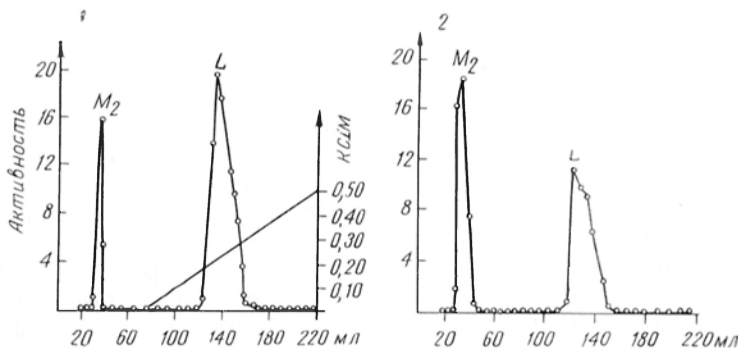


Рис. 1. Изоферменты пируваткиназы, выделенные при хроматографическом фракционировании на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой.

1 — нормальная печень (средние данные, 8 крыс); 2 — гепатома с умеренной степенью клеточной дифференцировки; L и M_2 — изоферменты пируваткиназы.

и элюировался с балластными белками исходным 0,01 М трис- HCl -буфером pH 7,5, содержащим 0,25 М сахарозу и 0,001 М ЭДТА. Второй пик активности (L -тип) элюировался при 0,18—0,20 М KCl (см. рис. 1) и содержал 87—88% от общей активности фермента.

При гепатоканцерогенезе наряду с изменением общей активности пируваткиназы возникли также изменения в ее изоферментном спектре (см. таблицу). Так, в первые месяцы введения канцерогена повышение общей активности фермента происходило в основном за счет L -типа изофермента. Затем активность снижалась до исходного уровня, а иногда и несколько ниже. Первичное обратимое повышение активности пируваткиназы является, очевидно, результатом токсического действия канцерогена. На это указывают также результаты морфологического исследования, свидетельствующие о том, что в первые месяцы введения ДЭНА наблюдались некоторые признаки токсического повреждения клеток печени, в частности ангилярная вакуолизация. На глубокие нарушения механизмов клеточного гомеостаза указывают данные [13], подтверждающие, что после двухнедельного введения ДЭНА крысам клетки печени теряют контроль над митотической активностью. С другой стороны, из литературы известно, что уже после первых аппликаций канцерогенов (диметил-1,2-бензантрацен) крысам изменяется функциональная активность коры надпочечников [14],

что вызывает нарушения гормонального гомеостаза и изменения активности ферментов.

Через 4 мес в печени отмечались признаки гиперплазии, усиливающейся к концу 5-го месяца; в этот период в цитоструктуре печени отмечалась очаговая и узловая гиперплазия. Кроме этого, у половины крыс

Общая активность пируваткиназы и ее изоферментов (в мкмоль на 1 мг белка за 1 ч) в процессе гепатокарциногенеза

Продолжительность введения ДЭНА, мес	Контроль				Гепатокарциногенез				Изменение об-щей активности, %
	число жи-вотных	активность			число жи-вотных	активность			
		общая	L-типа	M ₂ -типа		общая	L-типа	M ₂ -типа	
До введения	12	1,73	1,52	0,21	—	—	—	—	—
1	11	1,69	1,47	0,22	8	2,31	2,08	0,23	138
2					16	2,39	2,20	0,19	141
3	6	1,61	1,43	0,18	8	2,27	2,09	0,18	141
4	6	1,63	1,43	0,20	8	1,42	1,25	0,17	87
5	8	1,78	1,55	0,23	14	2,33	2,05	0,28	131
6					7	2,72	2,42	0,30	153
7	8	1,73	1,54	0,19	7	3,08	2,69	0,39	178
8					8	2,92	2,51	0,41	169

были найдены единичные узелки (диаметром 1—2 мм) высокодифференцированных гепатом. С возникновением гиперпластических явлений и первых признаков опухолевого роста на 5-м месяце опыта активность пируваткиназы вновь повышалась. В этот период наблюдалось повышение активности обоих типов изоферментов (рис. 2). С прогрессированием бластоматозного процесса в конце 6—7-го месяца, когда в печени возрастало количество опухолевых узлов и гепатом (диаметром 3—4 мм), активность изоферментов пируваткиназы, особенно M₂-типа, еще более повышалась. Одновременно гиперпластические явления заметно уменьшались. Через 8 мес у большинства животных были найдены обширные множественные опухоли в печени; они достигали диаметра 10 мм и более и нередко образовывали крупные конгломераты. Кроме гепатом с высокой степенью клеточной дифференцировки, имелись также гепатонцеллюлярные карциномы с различной степенью дифференцировки, а в единичных случаях — анапластические и смешанные гепатомы, в результате чего нормальной ткани печени оставалось очень мало. В этот период (в конце 7—8-го месяца) общая активность пируваткиназы составляла 170—180% от активности нормальной печени. Примерно в такой же мере была повышена и активность L-типа изофермента. Однако с конца 7-го месяца его активность больше не повышалась, в то же время активность M₂-типа проявляла явную тенденцию к повышению (см. рис. 2).

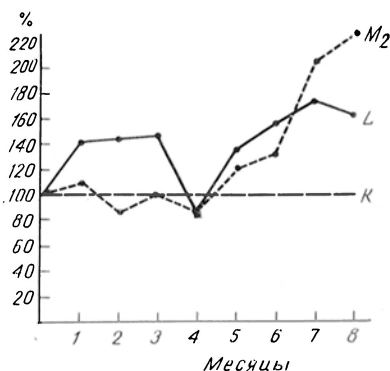


Рис. 2. Изменения активности L- и M₂-типа пируваткиназы в ткани печени при канцерогенезе.

Сплошная линия — активность L-типа, пунктирная — активность M₂-типа. K — контроль (100%).

В ткани первичных гепатом, индуцированных ДЭНА, активность пируваткиназы была заметно выше (от 2,35 до 5,0 усл. ед.), чем в нормальной печени (1,08—2,27 усл. ед.). Соотношение между L- и M₂-типом изоферментов изменялось в зависимости от клеточной дифференцировки [11]. Так, в гепатомах с высокой степенью клеточной дифференцировки активность L-типа составляла 81%, M₂-типа — 19% от общей активности пируваткиназы. В гепатомах с умеренной (до низкой) степенью клеточной дифференцировки активность M₂-типа составляла 42—44% от общей активности (см. рис. 1). Следует добавить, что изоферменты гепатом выделяли при таких же концентрациях KCl, как и изоферменты пируваткиназы нормальной печени.

Таким образом, результаты данной работы показывают, что изоферментный состав пируваткиназы изменяется не только в ткани гепатом, индуцированных ДЭНА, но и уже в процессе гепатоканцерогенеза. Если в первые месяцы введения канцерогена изменение активности изоферментов пируваткиназы (в основном повышение активности L-типа) можно рассматривать как реакцию на токсическое действие канцерогена, то сдвиги, возникающие в более поздние сроки опыта, связаны с неопластической трансформацией клеток печени. Повышение активности L- и M₂-типа пируваткиназы на ранних этапах гиперплазии свидетельствует о ранних изменениях в изоферментном составе этого фермента при опухолевом росте. По данным литературы [9], в гиперпластических узлах, индуцированных N-флуоренилацетамидом, значительно повышалась только активность M₂-типа пируваткиназы. Можно предполагать, что повышение активности обоих типов этого фермента на ранних этапах канцерогенеза в настоящей работе объясняется тем, что исследованию подвергались не только гиперпластические узелки, но и растворимая фракция всей ткани печени. Возможно, что в клетках печени, не затронутых неопластической трансформацией, активность L-типа фермента, адаптированного к различным регуляторным факторам [1, 3], на начальных этапах канцерогенеза не угнетается, а, наоборот, повышается. Этому не противоречат и данные о том, что в конце опыта, когда в печени преобладала опухолевая ткань, активность L-типа больше не повышалась, а понижалась.

Пируваткиназа играет важную роль в регуляции двух противоположных путей обмена углеводов — гликолиза и глюконеогенеза — в печени [15, 16]. Нарушение изоферментного состава пируваткиназы на ранних этапах гепатоканцерогенеза приводит к изменению ее регуляторных свойств [10] и, следовательно, к нарушению баланса между катаболизмом и анаболизмом углеводов в неопластических клетках. В литературе [6] имеются указания на то, что высокая активность пируваткиназы, по-видимому, является одним из основных факторов, обеспечивающих высокую гликолитическую активность в опухолевой ткани. Существуют также экспериментальные доказательства [17], позволяющие полагать, что пируваткиназная реакция может конкурировать за АДФ с дыхательной системой митохондрий [17] и что от активности и свойств пируваткиназы зависит не только скорость гликолиза, но и эффекты Крэбтри и Пастера в опухолевой ткани [18]. Таким образом, наблюдаемые в данной работе повышение общей активности пируваткиназы и изменения в ее изоферментном составе указывают на глубокую перестройку метаболизма клеток в ходе гепатоканцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tanaka T., Harano Y. et al. — J. Biochem. (Tokyo), 1967, v. 62, p. 71—91. — 2. Imamura S., Tanaka T. — Ibid., 1972, v. 71, p. 1043—1051. — 3. Berkel van Th. J. C. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 370, p. 140—152. — 4. Taylor C. B., Morris H. P., Weber G. — Life Sci., 1969, v. 8, p. 635—644. — 5. Farina F. A., Shatton J. B. et al. — Cancer Res., 1974, v. 34, p. 1439—1446. — 6. Weinhouse S., Shatton J. B. et al. — Biochimie,

1972, v. 54, p. 685—693. — 7. Criss W. E. — Cancer Res., 1971, v. 31, p. 1523—1542. — 8. Endo H., Eguichi M. et al. — Gann (Tokyo), 1972, v. 13, p. 235—250. — 9. Yanagi S., Makiura S. et al. — Cancer Res., 1974, v. 34, p. 2283—2289. — 10. Walker P. R., Potter V. R. — Advanc. Enzyme Regulat., 1972, v. 10, p. 339—364. — 11. Кильдесма Л. А. — Вестн. АМН СССР, 1978, № 1, с. 68—81. — 12. Irving M. G., Williams J. F. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, v. 68, p. 284—291. — 13. Barbason H., Fridman-Mandzio A. et al. — Europ. J. Cancer, 1977, v. 13, p. 13—18. — 14. Самунджан Е. И. Кора надпочечников и опухолевый процесс. Киев, 1973, с. 46. — 15. Krebs H. A., Eggleston L. V. — Biochem. J., 1965, v. 94, p. 291—292. — 16. Weber G. — Advanc. Enzyme Regulat., 1969, v. 7, p. 15—40. — 17. Gosalvez M., Ferez-Garcia J., Weinhouse S. — Europ. J. Biochem., 1974, v. 46, p. 133—140. — 18. Gosalvez M., Lopez-Alarcon L. et al. — Ibid., 1975, v. 55, p. 315—321.

Поступила 29/V 1978 г.

ALTERATIONS OF ISOENZYME SPECTRUM OF PYRUVATE KINASE IN HEPATOCARCINOGENESIS

L. A. Kil'dema

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

Together with an increase in the total activity of pyruvate kinase, alterations in the isoenzyme spectrum were observed in hepatocarcinogenesis caused by treatment of rats with diethylnitrosamine. The alterations might be divided into two steps: initial, reversible changes and changes immediately related to development of the blastomatous process. The total activity of pyruvate kinase was gradually increased with appearance of hyperplastic symptoms as well as of primary tumoral foci in liver tissue. The M_2 -type of pyruvate kinase tended to exhibit activation. In primary hepatomas the L-type of the enzyme was decreased and activity of the M_2 -type was increased.

УДК 616.633.75-074

В. И. Кулинский, Л. И. Кононова, Н. С. Саворенко

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБМЕНА ТРИПТАМИНА У ЧЕЛОВЕКА

Кафедры биохимии и госпитальной терапии Красноярского медицинского института
и красная клиническая больница № 1, Красноярск

Экскреция триптамина с мочой у человека не зависит от величины диуреза. Курс лечения неомицином существенно не влияет на экскрецию триптамина, что свидетельствует против гипотезы о его бактериальном происхождении. Экскреция триптамина возрастает при введении триптофана, ингибиторов моноаминоксидазы и их сочетания. Сиднофен и сиднокарб вызывают гипотриптаминирию. Высокая гипертриптаминирия обнаружена при активном хроническом гепатите и циррозе печени.

Триптамин был обнаружен в моче человека в 1956 г. Вскоре исследование его экскреции было внедрено как ценный тест для определения активности моноаминоксидазы (МАО) при лечении ингибиторами этого фермента [1]. Однако устойчивого интереса к триптамину в те годы не возникло, что могло быть обусловлено рядом причин. Прежде всего, несмотря на четкую фармакологическую активность триптамина [2], его физиологические функции оставались неясными. Триптамин не удалось обнаружить в тканях нормальных животных [3]. И, наконец, полагали, что триптамин мочи имеет в основном бактериальное происхождение [4]. В последние годы интерес к триптамину значительно возрос. Доказано его наличие в ряде тканей животных и человека и получены первые данные о физиологическом значении этого соединения [5—8]. Обнаружены изменения обмена триптамина при патологии головного мозга [2, 6] и соматических заболеваниях [2, 9, 10].

В связи с этим стала насущной разработка методических аспектов определения триптамина в моче человека и изучение его обмена в норме и при патологии. Этим вопросам и посвящена настоящая статья.

Методы исследования

К 0,5—5 мл мочи, содержащей 0,1—1 мкг (0,06—6 нмоль) триптамина, добавляют 0,1 мл 7% трилона Б, 0,1 мл 1% аскорбиновой кислоты, 0,05 мл 0,1% ализаринового желтого, доводят объем водой до 3—5 мл, подщелачивают, экстрагируют бензолом и переводят в норгарман, как описано ранее [11]. Флюориметрию проводят при $\lambda_1=365$ нм, $\lambda_2=450$ нм. Мы использовали флюориметр ЭФ-3М с повышенной чувствительностью с первичным фильтром ФК-1 и вторичными В₁-2. Параллельно с мочой каждый раз обрабатывают контроль на реактивы и 1 мкг триптамина. На нашем приборе показания флюориметра для первого соответствовали в среднем 9 делениям, для второго — 60—70 делениям. Стандартные растворы триптамина готовят на 0,01 н. HCl и сохраняют в холодильнике. Устойчивость маточного раствора, содержащего в 1 мл 50 мкг триптамина основания (61,4 мкг триптамина хлоргидрата), 6 мес, рабочего раствора (0,5 мкг/мл) — 1 мес.

Расчет производят по формуле: $TA = \frac{X \cdot V_1}{K \cdot V_2}$ мкг в сутки, где X — показания флюориметра для исследуемой мочи, K — показания для стандарта (1 мкг триптамина), V_1 — суточный диурез, V_2 — объем мочи, взятый на исследование, TA — количество триптамина в суточной моче (в мкг).

Градуировочный график линеен в диапазоне 0,05—1 мкг тирамина. Открытие добавленного триптамина — $98 \pm 2,4\%$, выход при экстракционных процедурах $73 \pm 3\%$ ($n=14$), ошибка параллельных определений $\pm 4\%$.

Определению тирамина в моче мешают флюоресцирующие лекарства: тетрациклин, хинин, допегит, витамин D, фолиевая кислота, мелипрамин. Моча сохраняется в холодильнике без потерь в течение еще 1—2 сут; подкисление проб до pH 4,0 не изменяет результатов.

Результаты и обсуждение

В норме экскреция триптамина составляет $146 \pm 3,6$ мкг (912 ± 22 нмоль, $n = 111$) в сутки. Это больше, чем средние величины, найденные другими авторами (79 и 104 мкг) [11, 12]. На нашем материале область допустимых значений для нормы с 95% надежностью составляет 72—220 мкг. Данные,

полученные пятью разными исследователями на протяжении 5 лет, отклонялись на $2,8 \pm 5,2\%$.

Распределение индивидуальных величин экскреции триптамина приведено на рис. 1. Оно является одновершинным, симметричным и очень хорошо соответствует нормальному распределению (по кри-

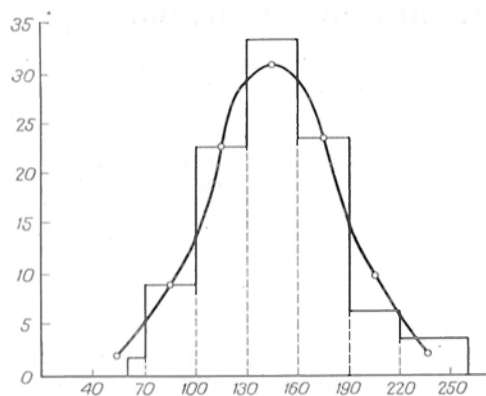


Рис. 1. Распределение содержания триптамина в суточной моче.

По оси абсцисс — суточная экскреция триптамина (в мкг); по оси ординат — частоты случаев (в %). Столбики — экспериментальные данные, точки и кривая — рассчитанное нормальное распределение.

терию $\chi^2 P > 0,9$). Следовательно, статистический анализ данных по содержанию триптамина в моче может производиться на основе нормального распределения или (при малой выборке) распределения Стюдента.

У мужчин суточная экскреция триптамина составляет 158 ± 8 мкг, у женщин — 142 ± 4 мкг; области допустимых значений соответственно равны 75—245 и 70—214 мкг. Хотя различие между полами невелико (10%), оно статистически значимо ($P < 0,05$). Распределение по возрасту: 17—20 лет — 153 ± 9 мкг, 21—30 лет — 147 ± 5 мкг, 31—40 лет — 134 ± 5 мкг,

41—60 лет — 133 ± 14 мкг, т. е. намечается тенденция к небольшому (на 15%) снижению экскреции триптамина с возрастом.

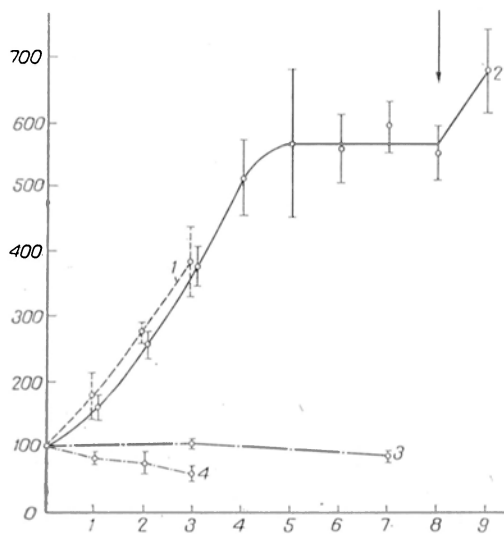
У 6 человек определения триптамина проводили 6—19 раз на протяжении 3 лет.

Средний коэффициент вариации равнялся $24 \pm 3\%$, что не отличается от разброса данных у разных лиц. Эти колебания могут отражать влияние сезона года, погоды, режима питания и индивидуальных ритмов. Сезонные ритмы концентрации триптофана и серотонина у людей уже описаны [13].

Изучена возможная взаимосвязь экскреции триптамина с функцией почек. Коэффициент корреляции между выделением триптамина и суточным диурезом очень мал и не достигает значимости: $r_s = +0,20$, $n = 94$, $P < 0,1$. У 5 человек проведены пробы с сухоедением в течение 1,5 сут и с водной нагрузкой (1,5 л воды за 1 ч). Несмотря на большие изменения диуреза (в 2—3 раза), экскреция триптамина за 6 и 24 ч изменяется незначимо ($P = 0,1—0,8$). Отсутствует корреляция триптамина как с диурезом в оба периода ($r_s = 0,42$, $P > 0,1$), так и с

Рис. 2. Влияние различных веществ на экскрецию триптамина с мочой. 1 — ипразид (ипронназид) в дозах 75—100—125 мг в сутки; 2 — иуредаль (ниаламид) в дозе 125 мг ежедневно, стрелкой показано введение на его фоне 1 г Д. Л. триптофана; 3 — неоминин по 0,75 г ежедневно; 4 — сиднофен в дозах 15—20—25 мг в сутки.

По оси абсцисс — продолжительность курса (в сут); по оси ординат — экскреция триптамина (в % к исходным значениям).

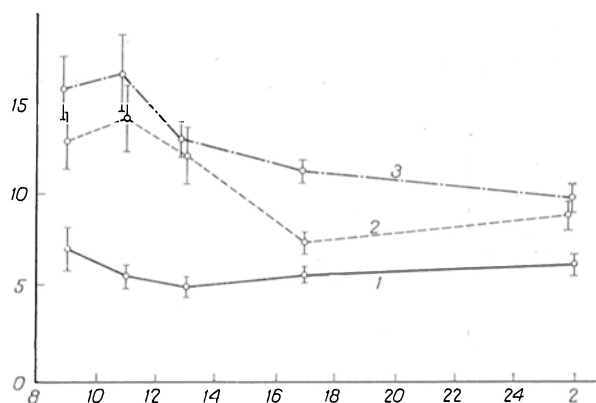


фильтрацией по креатинину (соответственно $r_s = -0,18$ и $+0,18$, $P \gg 0,1$). Это подтверждает правильность выражения результатов по определению триптамина в моче не в виде концентрации, а в суммарном выведении за сутки или другой период.

Известна точка зрения, что кишечные бактерии являются главным или даже единственным источником триптамина мочи у человека [4]. Однако данные, приводимые в пользу этого заключения, весьма противоречивы и неубедительны [4]. На нашем материале ($n = 14$) при проведении курса неоминина по 0,75 г в сутки (в части случаев дополнительно давался энтеросептол по 0,75 г в сутки) через 7 сут наблюдалась лишь небольшая тенденция к снижению экскреции триптамина, которая не была статистически значима (-18 ± 9 мкг, $n = 7$, $P < 0,1$) (рис. 2). Так как неоминин обладает широким спектром бактерицидного действия и с успехом применяется для проверки вклада кишечных бактерий в образование ряда метаболитов, например индикана [14] и индолилацетата [14—16], наши данные показывают, что триптамин мочи продуцируется организмом человека. В пользу этого представления свидетельствуют также данные, что неоминин, резко снижая выделение индикана и индолилацетата, не влиял на экскрецию триптамина у собак с экспериментальными инфицированными карманами в кишечнике [14]. Более того, даже прямое введение триптамина в кишечник не влияло на его экскрецию мочой [11]. Многочисленные данные, свидетельствующие, что индолилацетат мочи в значительной мере имеет бактериальное происхождение [14—16], не противоречат вышеизложенному заключению, так как бактерии образуют этот метаболит в основном не окислительным дезаминированием триптамина, а переаминированием триптофана [15].

Суточные изменения экскреции триптамина представлены на рис. 3 ($n = 15$). Максимальные величины экскреции наблюдались утром (8—10 ч) и ночью (22—8 ч), минимальные — в 12—14 ч ($P < 0,1$). Однако в целом суточные ритмы экскреции триптамина мало выражены. За первую половину дня выделяется в сумме 25,1% триптамина, за вечерние 6 ч — 23,6%, а за ночные 12 ч — 51,3%.

Нагрузка D, L-триптофаном увеличивает экскрецию триптамина, что подтверждает литературные данные [11]. При обеих исследованных дозах (1 и 2 г) максимум экскреции наблюдается через 2—4 ч после приема триптофана, затем скорость его выведения снижается (см. рис. 3). В обоих случаях за первые 12 ч с мочой выводится 66% дополнительно выведенного триптамина. Динамика экскреции триптамина после нагрузки триптофаном отличается от выведения индолацетата полным отсутствием второго пика,



Динамика экскреции триптамина после нагрузки триптофаном отличается от выведения индолацетата полным отсутствием второго пика,

Рис. 3. Суточная ритмика экскреции триптамина до и после нагрузки триптофаном.

1 — фоновая экскреция; 2 — триптофан в дозе 1 г; 3 — триптофан в дозе 2 г (внутрь в 8 ч утра). Точки соответствуют середине исследованного интервала.

По оси абсцисс — время суток (в ч); по оси ординат — скорость экскреции триптамина (в мкг/ч).

имеющего бактериальное происхождение [16]. Это является еще одним подтверждением того, что триптамин мочи образуется в организме человека.

Общий прирост содержания триптамина в моче за сутки после нагрузки триптофаном является одинаковым у мужчин и женщин. В среднем он равняется 1 г $\pm 73 \pm 8$ мкг при дозе триптофана ($n = 19$, $P \ll 0,001$), $\pm 134 \pm 13$ мкг при дозе 2 г ($n = 8$, $P \ll 0,001$), $\pm 256 \pm 16$ мкг при дозе 5 г ($n = 6$, $P \ll 0,001$), что соответствует 0,015, 0,013 и 0,010% введенной дозы триптофана (в пересчете на L-изомер). Если учесть, что суточное потребление L-триптофана равно 1 г [18], то средняя фоновая экскреция триптамина (146 мкг) соответствует 0,015% потребленного триптофана. Это показывает, что при нагрузке 1—2 г триптофана количество образующегося триптамина возрастает пропорционально дозе и лишь при увеличении дозы до 5 г намечается снижение скорости образования триптамина. Наши данные согласуются с тем, что значение K_m для декарбоксилирования триптофана — $1,4 \cdot 10^{-2}$ М [19] — на 3 порядка выше, чем концентрация триптофана ($1\text{—}6 \cdot 10^{-5}$ М) в печени, головном мозге и уровень свободной аминокислоты в плазме крови [3, 17]. Очевидно, что в условиях столь значительной ненасыщенности декарбоксилазы триптофаном любое увеличение его концентрации должно приводить к увеличенному синтезу триптамина в организме, а затем к возрастанию его экскреции, как это и наблюдалось в описанных экспериментах.

Если прием 2 г триптофана не индуцирует у человека триптофангидроксилазу [18], то для больших доз этот феномен хорошо известен. Стимулирующая же кинуренинового пути приведет к «утечке» триптофана, в результате биосинтез триптамина может понизиться, как это уже показано для серотонина [20]. Это обстоятельство может объяснить относительное снижение образования триптамина после введения 5 г триптофана. Различий между эффектом введения 1 г D, L-триптофана и 0,5 г L-триптофана не обнаружено ($P > 0,1$), что согласуется со стереоспецифичностью декарбоксилазы циклических аминокислот [19].

В отличие от триптамина нагрузка 0,25—2 г D,L-триптофана в интервале 2—24 ч не изменяет концентрацию серотонина в крови ($n = 22$, $P > 0,1—0,5$).

Введение ингибитора MAO пуредала (пиаламида) по 125 мг ежедневно монотонно повышает экскрецию триптамина на протяжении 5 сут, однако в последующие 3—4 сут наблюдается устойчивое плато (повышение в $5^{1/2}$ раза, $n = 14$, $P \ll 0,001$, см. рис. 2), свидетельствующее, очевидно, о практически полном ингибировании MAO в организме. В этих условиях в виде триптамина с мочой выводилось примерно 0,1% пищевого триптофана. Этот факт четко подтверждает, что триптаминовый путь обмена триптофана является минорным, так как в кинуренин превращается 2—12%, в индикан — 3—10%, в серотонин — 1—3%, а в виде неизменного триптофана выделяется 0,5—3% [18, 21]. Интересно также отметить, что в индолилацетат переходит 0,6—4% триптофана [15, 16, 18, 21], что согласуется с бактериальным происхождением значительной части индолилацетата.

Нагрузка 1 г D,L-триптофана на 8—10-й день курса пуредала увеличивает экскрецию триптамина в 2—3 раза более значительно, чем у интактных людей (см. рис. 2). Очевидно, вновь синтезированный триптамин также меньше метаболизируется в условиях полного ингибирования MAO.

Введение ипразида в возрастающей дозе (от 75 до 125 мг в сутки, $n = 9$) в течение 3 сут вызывает прирост триптамина мочи ($P \ll 0,001$), полностью идентичный эффекту пуредала (см. рис. 2).

Оба гидразиновых ингибитора MAO увеличивают концентрацию серотонина в крови: ипразид — на 3-и сутки на 81% ($P < 0,05$), пуредал — на 4—6-е сутки на 40% ($P < 0,05$). Однако на 7—10-е сутки курса пуредала концентрация серотонина возвращается к норме. Это может быть связано с ингибированием лимитирующего фермента биосинтеза триптофангидроксилазы накапливающимся серотонином или с активацией других путей метаболизма. Введение на фоне пуредала 1 г D,L-триптофана повышает концентрацию серотонина в крови на 37% ($P < 0,05$). В целом увеличение экскреции триптамина при введении ингибиторов MAO было гораздо резче выраженным, чем увеличение концентрации серотонина. Это связано, очевидно, с тем, что у триптамина в отличие от серотонина практически нет альтернативных путей метаболизма [1, 5, 11].

Учитывая высокий подъем экскреции триптамина после курса гидразиновых ингибиторов MAO, мы решили изучить эффект других психостимуляторов и антидепрессантов. Сиднофен в возрастающих дозах 15—20—25 мг в сутки четко снижает выведение триптамина ($n = 7$, $P < 0,01$, см. рис. 2). Этот результат оказался неожиданным, так как сиднофен является ингибитором MAO [22]. Близкий к сиднофену сиднокарб в дозах 10—15—20—30 мг в сутки вызывает аналогичную, но менее выраженную тенденцию (25—14%, $n = 10$, $P < 0,1$). Введение на его фоне 1 г D,L-триптофана не вызывало никакого повышения экскреции триптамина. Концентрацию серотонина сиднокарб не изменяет. Вероятно, сиднофен и сиднокарб снижают биосинтез триптамина. Четкий эффект нейротропных веществ на экскрецию триптамина свидетельствует в пользу значения триптамина для деятельности головного мозга.

Как уже упоминалось, экскреция триптамина изменяется и при соматических заболеваниях [2, 9, 10]. Особого внимания заслуживает в этом отношении патология печени, так как активность MAO по отношению к триптамину у человека максимальна в этом органе [23]. Можно было ожидать, что при поражении паренхимы печени катаболизм триптамина значительно снизится. Это полностью подтвердилось в наших исследованиях: при активном хроническом гепатите и особенно при циррозе печени экскреция триптамина значительно возрастает (соответственно в 2,1 и 2,7 раза, $n = 35$, $P \ll 0,001$). Выражаем благодарность В. Г. Яшунскому за синтез и предоставление сиднофена и сиднокарба, Г. П. Шелухе и Т. В. Россиевой — за участие в проведении некоторых экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sjoerdsma A., Oates J. A., Zaltzman P. et al. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1959, v. 126, p. 217—222. — 2. Franzen F., Eysell K. Biologically Active Amines Found in Man. Oxford, 1969, p. 40, 67—90. — 3. Eccleston D., Ashcroft G. W., Crawford T. B. B. et al. — J. Neurochem., 1966, v. 13, p. 93—101. — 4. Perry T. H. L., Hestrin M., MacDougall L. et al. — Clin. chim. Acta, 1966, v. 14, p. 116—123. — 5. Saavedra J. M., Axelrod J. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1973, v. 185, p. 523—529. — 6. Phillips S. P., Dursden D. A., Boulton A. A. — Canad. J. Biochem., 1974, v. 52, p. 447—451. — 7. Snodgrass S. R. — Advanc. Biochem. Psychopharmacol., 1974, v. 10, p. 141—150. — 8. Tabacoff B., Moses F., Phillips S. R. et al. — Experimentia, 1977, v. 33, p. 380—381. — 9. Кулинский В. И., Оловянныйкова Р. Я., Саворенко Н. С. и др. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии. 2-й. Материалы. Душанбе, 1974, с. 107—108. — 10. Кулинский В. И. — В кн.: Обмен и регуляторные эффекты моноаминов. Под ред. В. И. Кулинского и др. Красноярск, 1977, с. 7. — 11. Кулинский В. И., Шмютер Г. М. — Вопр. мед. химии, 1971, № 1, с. 103—109. — 12. Stachov A., Bousquet B., Dreux C. — Clin. chim. Acta, 1974, v. 50, p. 329—335. — 13. Wirz-Justice A., Feer H., Richter R. — Chronobiologia, 1974, v. 4, p. 165—166. — 14. Donaldson R. M., Dolcini H. A., Gray S. J. — Am. J. Physiol., 1961, v. 200, p. 794—796. — 15. Weissbach H., King W., Sjoerdsma A. et al. — J. biol. Chem., 1959, v. 234, p. 81—86. — 16. Austad W., Clamp J. R. — Biochim. biophys. Acta, 1967, v. 148, p. 84—91. — 17. Madras B. K., Cohen E. L., Munro H. N. et al. — Advanc. Biochem. Psychopharmacol., 1974, v. 11, p. 143—151. — 18. Wolf H. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1974, v. 33, Suppl. 136. — 19. Ichiyama A., Nacamura S., Nishizuka J. et al. — J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 1699—1709. — 20. Ланин И. П. — Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1976, т. 21, с. 151—157. — 21. Рудзит В. К. Триптофан. Л., 1973, с. 24—38. — 22. Яшунский В. Г., Машковский М. Д., Горкин В. З. и др. — Фармакол. и токсикол., 1970, № 3, с. 297—302. — 23. Levine R. Y., Sjoerdsma A. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1962, v. 109, p. 225—227.

Поступила 24/V 1978 г.

TRYPTAMINE METABOLISM IN MEN

V. I. Kulinsky, L. I. Kononova, N. S. Savorenko

Medical School, Regional Hospital N 1, Krasnoyarsk

A modified norharmaline method was used for estimation of tryptamine in human urine at normal state. Tryptamine excretion did not depend on diuresis. Administration of neomycin did not affect the tryptamine excretion, which is inconsistent with the hypothesis on bacterial origin of the amine. Dynamics of tryptamine excretion was studied after administration of tryptophane, inhibitors of monoamine oxidase and their combinations. Sydnophen and sydnocarb caused hypotryptaminuria. Marked hypertryptaminuria was observed in severe chronic hepatitis and liver cirrhosis.

УДК 616.248-07:616.155.3-008.939.963.32-074

С. И. Ялгут, С. А. Данилова, О. К. Кульчицкий

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ цАМФ В ЛЕЙКОЦИТАХ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Отдел аллергологии Института проблем онкологии АН УССР, лаборатория клинической биохимии Института геронтологии АМН СССР, Киев

Исследовали активность фосфодиэстеразы (ФДЭ) цАМФ в лейкоцитах больных бронхиальной астмой и здоровых людей и чувствительность фермента к различным концентрациям препаратов, вызывающих торможение и стимуляцию его активности: теофиллину, папаверину, инталу, имидазолу. Показано, что в межприступном периоде бронхиальной астмы активность фермента была такой же, как у здоровых людей, но диапазон чувствительности ФДЭ к действию фармакологических агентов шире. Длительная терапия ингибиторами ФДЭ не вызывает развития резистентности.

Циклический аденозин- и гуанозинмонофосфат (цАМФ и цГМФ) являются универсальными регуляторами процессов клеточного гомеостаза. На нормализацию метаболизма этих соединений направлено фармаколо-

гическое действие различных препаратов. В частности, терапевтический эффект теофиллина связан с накоплением цАМФ в клетке вследствие ингибирования фермента фосфодиэстеразы (ФДЭ), катализирующий превращение циклического нуклеотида в 5'-АМФ.

Целью данной работы явилось определение активности ФДЭ цАМФ в лейкоцитах больных бронхиальной астмой в зависимости от формы заболевания, а также исследование диапазона чувствительности ФДЭ к действию стимуляторов и блокаторов *in vitro*.

Выбор лейкоцитов в качестве объекта исследований был обусловлен следующими факторами. Во-первых, нарушение адренергических механизмов регуляции при бронхиальной астме наблюдается не только в ткани бронхолегочного аппарата, но и в других клетках. Например, показано [1], что понижение активности аденилатциклазы, участвующей в образовании цАМФ из АТФ, в лейкоцитах больных бронхиальной астмой адекватно отражает выраженность бронхоспастической реакции и чувствительность к стимуляции β_2 -адреномиметиками. Во-вторых, так как активность ФДЭ в различных клеточных элементах — нейтрофилах, эозинофилах и лимфоцитах — существенно не различается [2], то результаты исследования активности фермента в лейкоцитах сопоставимы у больных с различной лейкоцитарной формулой.

Исследовали чувствительность ФДЭ к следующим препаратам: теофиллину, папаверину, инталу, имидазолу. Первые три соединения блокируют, а имидазол стимулирует активность фермента [3—5].

М е т о д и к а

Определение активности ФДЭ цАМФ проводили в лейкоцитах 18 больных с обострением бронхиальной астмы (9 мужчин, 9 женщин) и 16 здоровых лиц (9 мужчин, 7 женщин). Возраст обследованных 30—50 лет. По классификации А. Д. Азо и П. К. Булатова, атоническая форма бронхиальной астмы наблюдалась у 5, а инфекционно-аллергическая — у 13 больных. Частота приступов — от одного до нескольких раз в сутки. Кровь для исследования брали утром, натощак; в течение 12 ч до этого больные не принимали фармакологических препаратов. В состав комплексной терапии у всех обследованных больных входил эуфиллин.

Препараты для исследования брали в следующих концентрациях: теофиллин $1,7 \cdot 10^{-1}$, $1,7 \cdot 10^{-2}$, $1,7 \cdot 10^{-3}$ М; папаверин $1 \cdot 10^{-1}$, $1 \cdot 10^{-5}$ М; интал $5 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-4}$ М; имидазол $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$ М.

Лейкоциты выделяли в градиенте плотности желатины из 10 мл гепаринизированной крови. Клетки отмывали в Krebs-рингер-фосфатной среде (рН 7,2), осаждали центрифугированием и разрушали небольшим количеством воды. Надосадочную жидкость использовали как источник фермента. Белок определяли методом Лоури.

Инкубационная смесь объемом 0,4 мл содержала 50 пмоль цАМФ фирмы «Reanal», 0,2 мкКи [^3H] цАМФ фирмы «Amersham», MgCl_2 — $8 \cdot 10^{-3}$ М, трис- HCl — $4 \cdot 10^{-2}$ М, 200 мкг белка и препарат в исследуемой концентрации. Пробы инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали кипячением в течение 3 мин, пробы охлаждали и добавляли в качестве свидетелей по 0,01 мл (0,2 мг) растворов 5'-АМФ и цАМФ, центрифугировали и 0,1 мл надосадочной жидкости наносили на хроматографическую бумагу ФН-1. Нисходящую хроматографию проводили в системе 1 М ацетат аммония — 96% этанол (15 : 35). Величина R_f в этой системе составляет для цАМФ 0,42, для АМФ — 0,14. Пятна, содержащие АМФ и цАМФ, вырезали и помещали во флаконы, содержащие 5 мл сцинтиллятора ЖС-8. Радиоактивность подсчитывали в счетчике «Intertechnique SL-30». Активность фермента выражали в пикомолях образовавшегося АМФ на 1 мг белка за 1 мин инкубации.

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

Исследование активности ФДЭ цАМФ в зависимости от формы бронхиальной астмы и в сопоставлении с данными, полученными на здоровых людях, дало следующие результаты.

Достоверных различий между группами выявлено не было.

На рисунке приведено процентное отношение активности ФДЭ цАМФ после инкубации с исследуемыми препаратами по сравнению с исходным уровнем. Как следует из рисунка, диапазон чувствительности ФДЭ к

действию как стимулирующих, так и блокирующих агентов у больных с atopической и инфекционно-аллергической формами бронхиальной астмы шире, чем у здоровых людей.

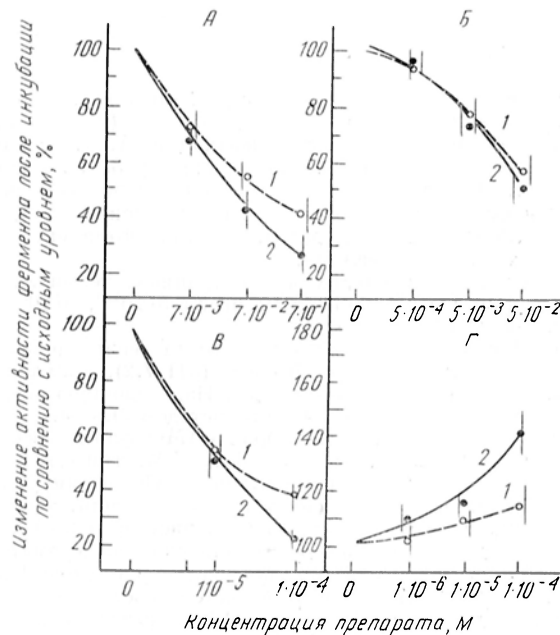
Установлено, что независимо от формы бронхиальной астмы активность ФДЭ цАМФ во внеприступном периоде не отличается от активности у здо-

Обследованные	Активность ФДЭ, цАМФ пкмоль на 1 мг белка/мин
Больные бронхиальной астмой	$1,1 \pm 0,09$ $P > 0,1$
атопической	$1,08 \pm 0,1$ $P > 0,1$
инфекционно-аллергической	$1,14 \pm 0,11$ $P > 0,1$
Здоровые люди	$1,05 \pm 0,07$

ровых лиц. Аналогичные результаты были получены другими авторами [2]. Однако в той же работе показано двукратное повышение активности ФДЭ на высоте развития астматического приступа. В этой связи обращает на себя внимание установленный нами факт, что у больных бронхиальной астмой ФДЭ цАМФ обладает повышенной чувствительностью к стимуляции имидазолом. Возможно, что эта функциональная особен-

ность фермента имеет место также при действии других факторов, в частности медиаторов гуморального и тканевого гомеостаза, и наряду с изменением чувствительности адренорецепторов может определять дисфункцию адренергической регуляции у больных бронхиальной астмой

Исследование активности ФДЭ цАМФ при инкубации с различными концентрациями ингибиторов — теофиллина, папаверина, интала — позволяет прийти к следующему заключению: у больных бронхиальной астмой фермент более чувствителен к действию изучавшихся препаратов, чем у здоро-



Изменение активности ФДЭ цАМФ после инкубации с исследованными препаратами у здоровых лиц (1) и больных бронхиальной астмой (2).

А — теофиллин; Б — интал; В — папаверин; Г — имидазол. О на оси абсцисс соответствует активности фермента без добавления препарата.

вых людей. Длительное применение этих соединений в терапевтических дозах не вызывает у больных развития резистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Parker C. W., Smith V. W. — J. clin. Invest., 1973, v. 52, p. 48—59.
2. Muo S., Ise T., Shibahara S. et al. — Ann. Allergy, 1976, v. 37, p. 201. — 207.
3. Гуций И. С. Немедленная аллергия клеток. М., 1976.
4. Федоров Н. А. — Регуляция пролиферации кровяных клеток. М., 1977.
5. Moore J. B. — Res. Commun. chem. Path. Pharmacol., 1977, v. 17, p. 639—647.

Поступила 6/VI 1978 г.

ACTIVITY OF cAMP PHOSPHODIESTERASE IN LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

S. I. Yalkut, S. A. Danilova

Department of Allergology, Institute of Oncological Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Laboratory of Clinical Biochemistry, Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Kiev

Activity of cAMP phosphodiesterase was similar in leukocytes of healthy persons and of the patients with bronchial asthma in the period of remission. The enzymatic activity was independent on the form of the impairment (infectious-allergic or atopic types). Sensitivity of cAMP phosphodiesterase to the effect of its inhibitors and stimulants — theophylline, papaverine and imidazole was higher in the patients as compared with the healthy persons. Prolonged therapy with the phosphodiesterase inhibitors did not lead to development of resistance.

УДК 576.851.48.094.3:577.133

И. И. Никольская, Н. В. Аникейчева, С. С. Александрова, С. С. Дебов

ОБНАРУЖЕНИЕ ПЛАЗМИД В КЛЕТКАХ E. COLI СК

Лаборатория энзимологии АМН СССР, Москва

Показано присутствие кольцевых сверхспирализованных плазмидных ДНК в клетках *E. coli* СК. Одна из плазмид п *Eco* СК-1 имеет длину 21,1 мкм, что соответствует молекулярной массе 43,7 мегадальтон, вторая плазида п *Eco* СК-2 имеет длину 14,2 мкм, что соответствует молекулярной массе 29,2 мегадальтон. При перекрестном титровании фага РВV-1-СК на штаммах *E. coli*, несущих плазмиду R11, и фага РВV-1-R11 на клетках *E. coli* СК наблюдается эффективная рестрикция. Полученные данные свидетельствуют о том, что *Eco* СК — тип хозяйской специфичности ДНК, отличен от *hsp* II — типа, обусловленного присутствием плазмид R11 и N-15

Как было показано нами ранее [1], клетки *E. coli* СК обладают новым ранее неизвестным типом специфичности ДНК в отношении хозяина, обозначенным в соответствии с принятой номенклатурой *Eco* СК [2]. Биологические свойства клеток этого штамма и их антибиотикоустойчивость [3] позволили предположить в них наличие плазмид, ответственных как за хозяйскую специфичность ДНК, так и за резистентность к антибиотикам. Одновременно при установлении нуклеотидных последовательностей (сайтов), узнаваемых цитозиновыми метилазами *E. coli* СК, было обнаружено, что сайт узнавания одного из ферментов может быть идентичен или изомерен сайту узнавания модифицирующего компонента *hsp* II типа хозяйской специфичности ДНК. В этой связи возникло предположение о присутствии в клетках *E. coli* СК одной из плазмид *hsp* II семейства. Данная работа посвящена обнаружению плазмидного материала в клетках *E. coli* СК и изучению некоторых особенностей обнаруженной плазмиды.

Методика

В работе использовали штаммы кишечной палочки СК, К-12, К-12-1100, R-245 и J-62 и бактериофаг РВV-1 [4]. Для выделения плазмидной ДНК использовали культуру клеток *E. coli* СК, взятых в стационарной фазе роста. Клетки лизировали в присутствии стандартной литической смеси описанного состава [5] и обрабатывали, как описано ранее [6]. Равновесное центрифугирование в градиенте CsCl проводили в течение 44 ч при 40 000 об/мин.

Скрещивание R⁺ и R⁻ штаммов проводили на твердой среде [11]. Плазмиду R11 передавали из штамма *E. coli* К-12-1100, R-245, резистентного к тетрациклину, штаммам *E. coli* J-62 и К-12, резистентным к стрептомицину. Об эффективности передачи судили по приобретению реципиентной тетрациклиноустойчивости. Контрольные культуры сеяли на чашки со стрептомицином и тетрациклином. Перекрестное титрование фага РВV-1 проводили стандартно [1]. При электронно-микроскопическом исследовании визуализацию ДНК проводили по методу Клайшмидта [7]. Молекулярную массу плазмиды определяли по методу Ланга [8].

Результаты и обсуждение

Седimentация в присутствии этидия бромид. Для получения прямых доказательств присутствия плазмиды в клетках *E. coli* СК мы провели фракционирование тотального препарата ДНК с помощью равновесного центрифугирования в градиенте CsCl в присутствии этидия бромида. Как известно, этот краситель хуже связывается с кольцевыми ковалентно замкнутыми ДНК по сравнению с линейными молекулами и открытыми кольцами, в результате чего изоплотностное центрифугирование дает возможность разделения хромосомной и плазмидной ДНК. Как видно на рис. 1, см. вклейку, при равновесном центрифугировании в присутствии этидия бромида депротеинизированного экстракта *E. coli* СК в пробирке появляются две интенсивно флюоресцирующие полосы. Одна из них локализуется в зоне $1,3975 \text{ г/см}^3$ и представляет собой линейные молекулы в основном хромосомного происхождения. Вторая полоса с величиной $\rho=1,4025 \text{ г/см}^3$ представляет собой ковалентно замкнутые кольцевые молекулы.

Эффективность рестрикции фага PBV-1 в клетках с *Eco* СК и *hsp* II-типом хозяйской специфичности

Фенотип фага	Эффективность титрования на разных штаммах <i>E. coli</i> *					
	СК	К-12·1100· R-245	J-62·R11	К-12·R11	J-62	К-12
PBV-1-СК	100	0,01	0,015	0,01	98	10
PBV-1-К-12·1100, R-245·R11	0,004	100	—	—	—	—
PBV-1-J-62·R11	6,2	93	100	—	91	—
PBV-1-К-12·R11	0,1	91	—	100	—	92

* В процентах по отношению к титру фага на гомологичном хозяине.

Электронная микроскопия. Фракции градиента с плотностью $1,4025 \text{ г/см}^3$, содержащие кольцевую ДНК, экстрагировали изопропанолом и диализовали против 0,5 М ацетат-аммонийного буфера pH 7,5. При электронной микроскопии образцов по методу Клайншмидта было видно большое количество сверхспирализованных кольцевых молекул и небольшое количество открытых колец. Поскольку препараты ДНК готовились без добавления формамида, то для оценки размеров плазмиды были пригодны лишь открытые формы кольцевых молекул. На рис. 2, а и б, см. на вклейке, представлены электронограммы двух таких колец, имеющих соответственно размеры 21,1 и 14,2 мкм. Кольцевые молекулы указанных размеров постоянно обнаруживаются в препаратах ДНК, экстрагированных из *E. coli* СК, что указывает на присутствие как минимум двух разных плазмид. Молекулярная масса этих плазмид в соответствии с коэффициентом пересчета Ланга [8] ($2,07 \times 10^{10}$ дальтон на 1 см длины) составляет 43,7 мегадальтон для п *Eco* СК-1 и 29,2 мегадальтон для п *Eco* СК-2.

Перекрестное титрование фага. Для решения вопроса о том, не являются ли п *Eco* СК производными так называемого *hsp* II семейства плазмид [9], мы провели перекрестное титрование фага PBV-1 в клетках *E. coli* СК и штаммах *E. coli*, которые несут плазмиду R11.

При определении эффективности титрования фага с определенным фенотипом на разных хозяевах с целью идентификации систем хозяйской специфичности важно учитывать эффективность адсорбции фага на разных клетках. В связи с этим мы провели передачу плазмиды R II из исходного штамма К-12·1100, R-245 в клетки *E. coli* J-62, лишенные системы специфичности ДНК, а также в клетки *E. coli* К-12, имеющие собственную систему модификации и рестрикции [10].

Из таблицы видно, что фаг, выраженный в клетках *E. coli* СК, рестрикуется с высокой эффективностью всеми без исключения штаммами, несущими плазмиду RII. Низкая эффективность высева определяется исключительно рестрикционным компонентом RII, поскольку титры фага PBV-1-СК оказались одинаковыми как на гомологичном штамме *E. coli* СК, так и на клетках *E. coli* J-62 без плазмиды RII. Клетки *E. coli* K-12, в соответствии с данными литературы [10], оказывают слабое рестриктивное действие. Фаг PBV-1·RII ограничивается в клетках *E. coli* СК с такой же эффективностью, как и фаг PBV-1-СК в системе RII. Более сложная картина наблюдается при титровании на клетках *E. coli* СК фага PBV-1, выращенного в клетках RII J-62 и RII K-12. Уровень рестрикции здесь оказывается значительно более низким, особенно в первом случае. Эти данные свидетельствуют о сложной картине модификации фаговой ДНК не только RII-метилазой, но и клеточным ферментом. Можно думать, что в клетках *E. coli* J-62 в большей степени и в клетках K-12 в меньшей присутствует метилаза ДНК, способная обеспечить частичную защиту фаговой ДНК от рестриктаз СК-типа, в то же время, как видно из таблицы, ни метилаза, специфическая для фактора RII, ни бактериальная модифицирующая метилаза, кодируемая геном *dam*, таким действием не обладает. В качестве аналогии можно указать на интерференцию метилазы из *E. coli* K-12 и *E. coli* С, кодируемых геном *dam* с рестрикцией *hsp* II [9].

Авторы приносят глубокую благодарность старшему научному сотруднику лаборатории внехромосомной наследственности Всесоюзного научно-исследовательского института синтеза белка В. С. Тюрину за электронную микроскопию плазмидной ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nikolskaya I. I., Lopatina N. G., Chaplygina N. M. et al. — *Molec. Cell. Biochem.*, 1976, v. 3, p. 79—86. — 2. Smith H. O., Nathans D. — *J. molec. Biol.*, 1973, v. 81, p. 419—423. — 3. Аникиевичева Н. В., Никольская И. И., Дебов С. С. — *Бюлл. эксп. биол.*, 1978, № 4, с. 441—443. — 4. Tikhonenko T. I., Velikodvorskaya G. A., Bobkova A. F. et al. — *Nature*, 1974, v. 249, p. 454—457. — 5. Clewell D. B. — *J. Bact.*, 1962, v. 110, p. 667—676. — 6. Humphreys G. O., Willshaw G. A., Anderson E. S. — *Biochim. biophys. Acta*, 1975, v. 383, p. 457—463. — 7. Kleinschmidt A. K. — *Meth. Enzymol.*, 1968, v. 17-B, p. 361—379. — 8. Lang D. — *J. molec. Biol.*, 1970, v. 54, p. 557—565. — 9. May M., Hattman S. — *J. Bact.*, 1975, v. 122, p. 129—138. — 10. Гендон Ю. З., Поглазов Б. Ф., Тихоненко Т. И. *Нуклеиновые кислоты и белки вирионов*. М., 1975. — 11. Миллер Дж. *Эксперименты в молекулярной генетике*. М., 1976.

Поступила 6/VI 1978 г.

DETECTION OF PLASMIDES IN *E. COLI* СК CELLS

I. I. Nikol'skaya, N. V. Anikeycheva, S. S. Alexandrova, S. S. Debov

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

Superspiralized coiled plasmide DNA were found in cells *E. coli* СК. One of plasmides pEco СК-1 had a size 21.2 μ m that corresponded to molecular mass 43.7 megadaltons, another plasmide pEco СК-2 with the size 14.2 μ m had a molecular weight 29.2 megadaltons. Effective restriction was observed in cross titration using phage PBV-1-СК for *E. coli* strains carrying R II plasmide and phage PBV-1·R II for *E. coli* СК cells. The data obtained suggest that the Eco СК type with DNA of host specificity is distinct from *hsp* II type due to presence of R II and N-15 plasmides.

А. В. Мужиченко, Г. А. Хардина

ВЛИЯНИЕ БРЮШНО-ТИФОЗНОГО ЭНДОТОКСИНА И ЛИПИДА А НА СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ

Кафедра биохимии и проблемная лаборатория кафедры госпитальной терапии Волгоградского медицинского института

Методом тонкослойной хроматографии выявлены изменения в содержании отдельных фосфолипидов (Фл) печени мышей под влиянием брюшнотифозного липополисахарида (ЛПС) и липида А. Отмечено существенное повышение уровня холинсодержащих Фл к 6 и 24 ч интоксикации. Липид А вызывал эффект, сходный с действием целого ЛПС, однако менее продолжительный. Оба токсических препарата изменяли прочность связи фосфатидилхолина и кардиолипина с компонентами клеток печени.

Как уже сообщалось [1], под влиянием брюшно-тифозного эндотоксина происходят значительные изменения в содержании липидов в ткани печени. Отмечено накопление цитоплазматических форм нейтральных липидов без существенных изменений со стороны общих фосфолипидов (Фл).

В последние годы Фл привлекают внимание исследователей не только как компоненты мембранных структур клеток, но и как важные составные части ферментных систем мембран, обуславливающие их активность [2—5]. С другой стороны, попытки выяснения механизмов действия микробных липополисахаридов (ЛПС) на клетки хозяина показали [6, 7], что эндотоксины обладают особым сродством к мембранам. Авторы предполагают, что это сродство обусловлено липидной частью ЛПС и фосфолипидным компонентом мембран. В связи с этим представляются вполне оправданными попытки выяснить возможные изменения фосфолипидного состава ткани печени под влиянием ЛПС.

В настоящей работе изучали влияние брюшно-тифозного эндотоксина и изолированного из него липида А на фосфолипидный спектр ткани печени мышей. Кроме того, исследовали влияние обоих токсических препаратов на экстрагируемость отдельных представителей Фл из ткани печени.

Методика

Опыты проводили на 7-недельных самцах белых мышей, находившихся на обычной лабораторной диете. Условия проведения опытов описаны ранее [8]. Фосфолипидный состав печени исследовали через 3, 6 и 24 ч после введения брюшно-тифозного ЛПС в дозе LD_{50} и 125 мкг липида А, полученного из этого же ЛПС. Липиды извлекали по методу [9] в два этапа.

Вначале экстрагировали адсорбционно-связанные (АС) липиды, многократно обрабатывая ткань печени смесью хлороформа с метанолом (2 : 1) в комнатных условиях. Затем остаток ткани подвергали 2-часовой обработке кипящим этанолом и экстракцию повторяли. Полученные таким образом липиды обозначали как прочно связанные (ПС). Полноту экстракции обеих форм липидов контролировали пробой на люминесценцию экстрактов в УФ-лучах. Объединенные экстракты АС и ПС липидов отдельно подвергали очистке от нелипидных примесей, а затем исследовали на содержание липидного фосфора, как указано [1], и фосфолипидный состав методом тонкослойной хроматографии.

Разделение осуществляли на пластинках с тонким (0,25—0,3 мм) слоем силикагеля КСК, к которому для фиксации добавляли 5% медицинского гипса. Для восходящей хроматографии использовали систему дибутиловый эфир — ледяная уксусная кислота — хлороформ и вода (80 : 70 : 12 : 9,5). Идентификацию Фл проводили с помощью свидетелей, а также цветных тестов [10, 11]. Высушенные хроматограммы проявляли обработкой парами йода. В данных условиях смесь липидов печени постоянно содержала фосфатидилинозит (ФИ), сфингомиелин (СФ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и фосфатидилглицерин (ФГ). Непостоянно в виде следов выявлялись лизоформы Фл. В каждом пятне Фл на хроматограммах определяли содержание липидного фосфора.

Данные о количестве липидного фосфора в каждой фракции АС и ПС форм Фл рассчитывали в мг на 1 г сухого веса ткани печени контрольных и опытных животных. Эти данные в виде средних величин приведены в табл. 1—4.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены результаты определения АС форм Фл у интактных и опытных животных после введения ЛПС. Основная масса (85%) всех Фл печени контрольных мышей находится в АС форме. В этом состоянии оказались все ФХ, ФЭ, ФС, ФИ. При этом холинсодержащие Фл составили 42,7%, так называемые нейтральные — 55,4%, а кислые Фил — несколько меньше половины (44,6%) АС Фл.

Через 3 ч после введения ЛПС отмечено достоверное повышение уровня ФХ ($P<0,1$) и ФИ ($P<0,05$); другие фракции существенно не изменялись.

Таблица 1

Содержание АС Фл (в мг/г) в ткани печени после введения эндотоксина				
Фракция Фл	Контроль ($n=10$)	Время интоксикации, ч		
		3 ($n=6$)	6 ($n=6$)	24 ($n=6$)
ФХ	$0,470\pm 0,05$ —	$0,622\pm 0,06$ $P<0,1$	$0,512\pm 0,04$ $P>0,1$	$0,680\pm 0,05$ $P<0,05$
ФЭ	$0,280\pm 0,03$ —	$0,250\pm 0,02$ $P>0,1$	$0,312\pm 0,02$ $P>0,1$	$0,264\pm 0,015$ $P>0,1$
СФ	$0,465\pm 0,04$ —	$0,526\pm 0,04$ $P>0,1$	$0,498\pm 0,03$ $P>0,1$	$0,300\pm 0,02$ $P<0,01$
ФС	$0,280\pm 0,03$ —	$0,390\pm 0,04$ $P>0,1$	$0,497\pm 0,02$ $P<0,02$	$0,302\pm 0,02$ $P>0,1$
ФИ	$0,470\pm 0,04$ —	$0,625\pm 0,05$ $P<0,05$	$0,352\pm 0,03$ $P>0,1$	$0,350\pm 0,04$ $P>0,1$
ФГ	$0,221\pm 0,03$ —	$0,315\pm 0,04$ $P>0,1$	$0,290\pm 0,02$ $P>0,1$	$0,270\pm 0,03$ $P>0,1$
Липидный фосфор, всего	$2,186\pm 0,40$ —	$2,720\pm 0,70$ $P>0,1$	$2,461\pm 0,55$ $P>0,1$	$2,160\pm 0,65$ $P>0,1$

К 6 ч интоксикации наблюдали возвращение изменившихся фракций к исходному уровню, и лишь для ФС он был существенно выше ($P<0,02$).

Суточная интоксикация заметно отражалась на содержании холинсодержащих Фл. При этом уровень ФХ повышался ($P<0,05$), а уровень СФ был ниже ($P<0,01$), чем у контрольных животных. Соотношения нейтральных и кислых Фл при интоксикации изменялись незначительно, так же, как и сумма АС липидного фосфора.

Как видно из табл. 2, среди ПС Фл у контрольных мышей присутствовали лишь СФ и ФГ. Доля этих форм Фл составила соответственно 34,9 и 33% от общего количества СФ и ФГ. В печени опытных животных через 3 ч после введения ЛПС ПС форму ФГ не обнаруживали, так же, как и в более поздние сроки интоксикации. Вместо кардиолипина выявляли ФХ, количество которого было постоянным и составляло 25—32% общего лецитина. Таким образом, повышение уровня ФХ в печени после введения ЛПС происходит как за счет АС, так и за счет появления ПС формы. Содержание ПС формы СФ у опытных животных к 3 ч было несколько ниже ($P<0,1$) исходного, а затем не отличалось от такового у интактных мышей. Общее содержание ФГ под действием ЛПС не изменялось, отмечен лишь переход его в АС форму.

Введение липида А также отражалось на содержании отдельных Фл ткани печени. Из табл. 3 видно, что уже через 3 ч после введения препарата достоверно повышается количество АС форм ФХ, ФИ, ФГ ($P<0,1$; $0,01$; $0,01$ соответственно). К 6 ч нарастает уровень ФЭ, СФ и ФС ($P<0,1$; $0,05$; $0,05$ соответственно). Содержание ФИ к этому времени снижается до исходного. Если сравнивать изменения со стороны ФХ, СФ, ФИ

и ФС под влиянием ЛПС с изменениями, вызванными липидом А, не трудно заметить определенную аналогию.

Отмечено повышение содержания как кислых (ФС, ФИ, ФГ), так и нейтральных (ФХ, ФЭ, СФ) Фл, хотя к 6 ч уровень последних был су-

Т а б л и ц а 2

Содержание ПС Фл (в мг/г) в ткани печени после введения эндотоксина

Фракция Фл	Контроль (n=10)	Время интоксикации, ч		
		3 (n=6)	6 (n=6)	24 (n=6)
ФХ	—	0,251±0,02	0,250±0,03	0,243±0,02
ФЭ	—	—	—	—
СФ	0,250±0,02	0,170±0,012 P<0,1	0,220±0,02 P>0,1	0,210±0,015 P>0,1
ФС	—	—	—	—
ФИ	—	—	—	—
ФГ	0,110±0,012	—	—	—
Липидный фосфор, всего	0,360±0,03 —	0,420±0,12 P>0,1	0,470±0,06 P>0,1	0,450±0,05 P>0,1

Т а б л и ц а 3

Содержание АС Фл (в мг/г) в ткани печени после введения липида А

Фракция Фл	Контроль (n=7)	Время интоксикации, ч		
		3 (n=6)	6 (n=6)	24 (n=6)
ФХ	0,430±0,03 —	0,600±0,07 P<0,1	0,680±0,06 P<0,05	0,410±0,03 P>0,1
ФЭ	0,180±0,015 —	0,223±0,02 P>0,1	0,485±0,05 P<0,1	0,200±0,018 P>0,1
СФ	0,320±0,04 —	0,490±0,03 P>0,1	0,650±0,06 P<0,05	0,370±0,03 P>0,1
ФС	0,250±0,03 —	0,360±0,02 P>0,1	0,650±0,05 P<0,05	0,250±0,02 P>0,1
ФИ	0,340±0,04 —	0,590±0,06 P<0,01	0,385±0,04 P>0,1	0,250±0,02 P>0,1
ФГ	0,150±0,01 —	0,310±0,03 P<0,01	0,380±0,04 P<0,01	0,150±0,012 P>0,1
Липидный фосфор, всего	1,680±0,50 —	2,580±0,78 P>0,1	3,230±0,60 P<0,1	1,640±0,40 P>0,1

щественно выше. Вместе с тем нельзя не отметить, что эффект, вызванный введением липида А, был более кратковременным. Уже к концу суток содержание АС форм Фл возвращалось к исходному уровню.

По данным табл. 4 можно судить, что липид А, подобно целому ЛПС, изменяет характер взаимодействия ФГ и ФХ с компонентами клеток печени. То, что этот эффект развивается несколько позже, связано, по-видимому, с трудностью всасывания липида А из брюшной полости. Содержание ПС формы СФ под влиянием липида А не изменялось.

Согласно нашим данным, липид А вызывает изменения со стороны АС и ПС форм Фл, во многом сходные с изменениями, индуцированными целым ЛПС. Влияние токсических факторов сводилось к повышению содержания холинсодержащих Фл. Подобные изменения, как полагают [12], приводят к повышению антиокислительной активности мембран гепатоцитов.

В литературе имеются указания [13] на различный характер взаимодействия отдельных Фл с белками и другими липидами клеток печени. ПС

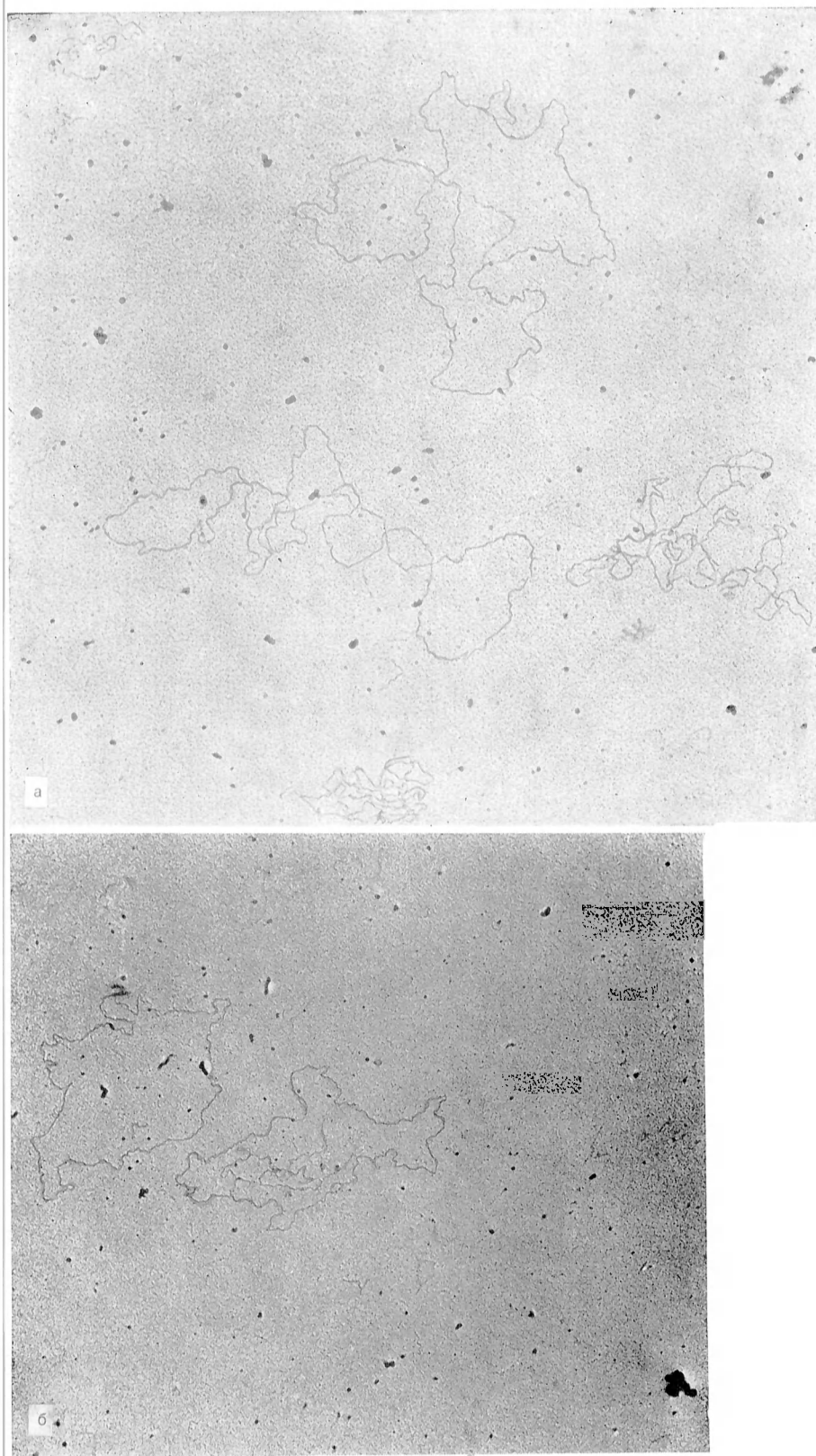


Рис. 2. Электронная микроскопия плазмид п Есо СК-1 (а) и п Есо СК-2 (б) из клеток *E. coli* СК.
Ув. 7500.

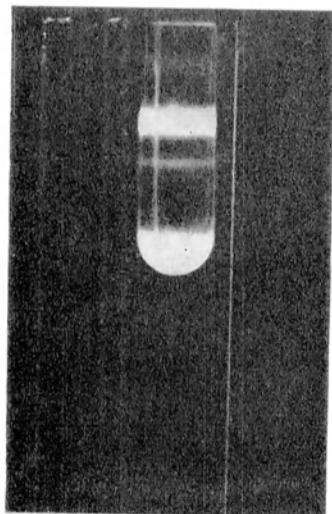


Рис. 1. Фракционирование totalной ДНК *E. coli* СК при равновесном центрифугировании в градиенте CsCl в присутствии этидия бромида.

Условия центрифугирования: 40 000 об/мин, 44 ч, 20°C. Верхняя полоса — линейные молекулы ДНК и открытые кольца; нижняя полоса — сверхспирализованные молекулы плазмидной ДНК.

К ст. В. М. Плескова и др.

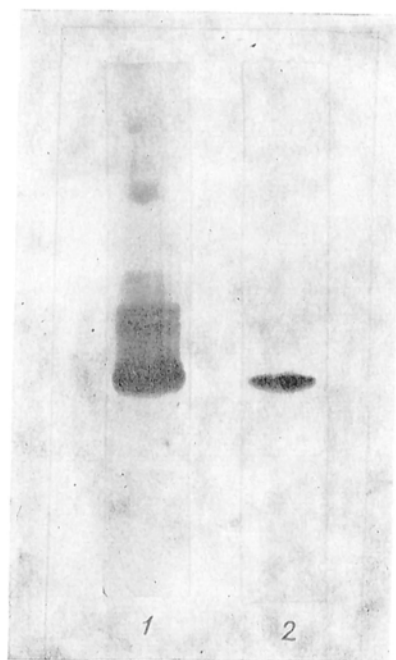


Рис. 3. Электрофорез выделенных фракций в 15% ПААГ с 6,25 М мочевиной. 1 — электрофореграмма фракции 4 (см. рис. 1); 2 — электрофореграмма фракции 2 (см. рис. 2).

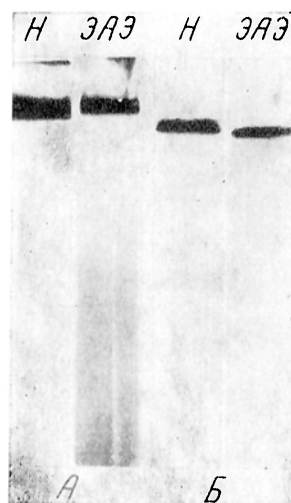


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ растворимых форм ГК гладкой мышцы пилорической (А) и фундальной (Б) частей желудка кролика в норме (H) и при ЭАЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мужиченко А. В., Никольская О. Н., Хардина Г. А. — *Вопр. мед. химии*, 1978, № 3, с. 334—338. — 2. Леппинджер А. Биохимия, молекулярные основы структуры и функций клетки. М., 1974. — 3. Левитина М. В. — *Успехи совр. биол.*, 1975, т. 80, вып. 1 (4), с. 57—70. — 4. Грибанов Г. А. — Там же, вып. 3, с. 383—398. — 5. Микельсаар Х., Северина И. И., Скулачев В. П. — Там же, 1974, т. 78, вып. 3, с. 348—370. — 6. Nicholas G. G., Mela L. M., Miller L. D. — *Ann. Surg.*, 1972, 176, p. 579—589. — 7. Shands J. W. — *J. infect. Dis.*, 1973, v. 128, Suppl. p. 197—201. — 8. Мужиченко А. В. — *Вопр. мед. химии*, 1975, № 5, с. 494. — 9. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. — *J. biol. Chem.*, 1957, v. 226, p. 407. — 10. Новицкая Г. В. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии фосфолипидов. М., 1972. — 11. Кейтс И. Техника липидологии. М. 1975. — 12. Аристархова С. А., Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б. и др. — *Докл. АН СССР*, 1976, т. 228, № 1, с. 215. — 13. Sauner M. J., Levy M. — *J. Lipid. Res.*, 1971, v. 12, p. 71. — 14. Awasthy J. C., Chuand I., Kennan I. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1971, v. 226, p. 42. — 15. Bendetto D. A., Shands J. W., Shah D. O. — *Ibid.*, 1973, v. 298, p. 145—147. — 16. Ляхович В. В. — *Науч. докл. высш. школы. Биол. науки*, 1976, № 2, с. 34—48. — 17. Kato M. — *J. Bact.*, 1972, v. 112, p. 268—275. — 18. Dragomirescu M., Buzinski S., Rocsin M. et al. — *Bact. virusol. parasitol. Epidem.*, 1974, v. 19, p. 401. — 19. Dolon M. A., Walker P. Y. — *Experientia (Basel)*, 1976, v. 32, p. 179—181. — 20. Мужиченко А. В. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 6, с. 644—651.

Поступила 20/VI 1978 г.

EFFECT OF TYPHOID ENDOTOXIN AND LIPID A ON CONTENT OF PHOSPHOLIPIDS IN LIVER TISSUE

A. V. Muzhichenko, G. A. Khardina

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

Content of phospholipid fractions was altered in mice liver tissue after intraperitoneal administration of typhoid lipopolysaccharide and of lipid A, isolated from the lipopolysaccharide. The intoxication was accompanied by an increase in content of choline-containing phospholipids within 6 and 24 hrs as well as by an alteration in the ratio of the fractions. Effect of lipid A on the tissue phospholipid spectra resembled the effect of the lipopolysaccharide, but was less prolonged. The lipopolysaccharide and lipid A altered the stability of phosphatidyl choline and cardiolipin bonds with the components of liver cells.

УДК 612.351.11-087.4

Л. Ф. Панченко, В. Д. Антоненков

ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФРАКЦИИ ПЕРОКСИСОМ, ВЫДЕЛЕННОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИПОТОНИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР

Кафедра биохимии медико-биологического факультета II Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова, Москва

Фракцию пероксисом печени крыс выделяли, используя гипотоническую обработку митохондрий и лизосом. Активность маркерных ферментов пероксисом в пересчете на 1 мг белка в получаемой фракции повышается в 32—34 раза по сравнению с активностью в гомогенате. Исследование удельной активности маркерных ферментов митохондрий, лизосом и микросом показало, что примесь перечисленных субклеточных структур во фракции пероксисом составляет не более 15—20% от общего количества белка в ней. Приведены результаты исследования действия гипотонического лизиса на лизосомы и митохондрии. Показано, что после осмотического шока и выхода из этих органоидов ферментов матрикса происходит уменьшение плавучей плотности лизосом до 1,16—1,20 г/см³, тогда как плавучая плотность митохондрий не изменяется.

Выделение очищенной фракции пероксисом является необходимым этапом при исследовании молекулярной организации, механизма функционирования и биологической роли этих сравнительно мало изученных субкле-

точных структур. В настоящее время для выделения пероксисом наиболее часто применяют методы, включающие предварительное введение животному неионного детергента тритона WR-1339 [1, 2]. Данное вещество избирательно поглощается лизосомами некоторых тканей, вследствие чего плавучая плотность этих органоидов резко уменьшается и возникает возможность их отделения от пероксисом в градиенте плотности сахарозы. Однако необходимость использования детергента существенно ограничивает возможности применения указанных методов [1—4]. В частности, они практически неприменимы при получении пероксисом из патологически измененных или подвергнутых воздействию фармакологических препаратов тканей.

Известно, что в отличие от митохондрий и лизосом, пероксисомы не подвергаются гипотоническому лизису из-за сравнительно высокой проницаемости их мембраны для осмотически активных веществ, включая такие обычно применяемые осмотические протекторы, как сахароза или маннит [1, 5]. Ранее нами был предложен метод выделения пероксисом, основанный на осмотической инертности этих субклеточных структур [6].

В настоящей работе приведена ферментативная характеристика пероксисомальной фракции, полученной из печени крыс по модификации предложенного метода. Кроме того, представлены результаты сравнительного исследования некоторых свойств лизосом и митохондрий при инкубации частиц в гипотонических растворах.

Методы исследования

Для экспериментов отбирали белых крыс-самцов массой около 200 г, содержавшихся в течение суток без пищи. Гомогенат печени готовили, как описано ранее [6, 7]. Фракцию λ , содержащую лизосомы, пероксисомы и некоторое количество митохондрий, выделяли по методу, предложенному Лейтоном и соавт. [2], несколько модифицировав его. Гомогенат фильтровали через нейлоновую марлю и центрифугировали при 2200 g в течение 10 мин. Надосадок сливали, а осадок ресуспендировали в 4 объемах среды выделения (0,25 M сахароза, 5 mM трис-ацетатный буфер pH 7,0), повторно гомогенизировали и вновь центрифугировали при тех же условиях. Надосадки объединяли и центрифугировали при 12 500 g в течение 20 мин. Органоиды, оказавшиеся в полученном осадке, подвергали гипотонической обработке, ресуспендируя в 5 mM трис-ацетатном буфере pH 7,0, из расчета 8 мл буфера на 1 г сырой массы печени. Обработку проводили на холоде в течение 15—20 мин. Затем частицы вновь осаждали при 12 500 g в течение 20 мин и осадок тщательно ресуспендировали в небольшом объеме среды лизиса, доводя конечный объем суспензии до 10 мл. К этой суспензии добавляли 90 мл 51% сахарозы, приготовленной на среде лизиса, и тщательно перемешивали: конечная концентрация сахарозы 46%. В центрифужных пробирках вместимостью 55 мл готовили двухступенчатый градиент: 5 мл 60% и 10 мл 48% сахарозы. На этот градиент осторожно наслаивали 35 мл содержащего частицы раствора. Центрифугирование проводили в бакетном роторе при 65 000 g в течение 5 ч при 4°C, центрифуга УЦП-60 (СССР). Для извлечения содержимого из пробирок использовали длинную иглу, соединенную трубками с перистальтическим насосом. Фракции собирали, начиная от дна пробирки. Выходящая первой белковая фракция имела зеленоватый оттенок и содержала очищенные пероксисомы.

Влияние тоничности раствора на освобождение ферментов из митохондрий, лизосом и пероксисом исследовали, ресуспендируя осадок фракции λ непосредственно в среде, содержащей сахарозу в соответствующей концентрации. Пробы инкубировали при 4 или 20°C определенные промежутки времени, отбирали некоторое количество суспензии для исследования общей и свободной активности ферментов, а остальное центрифугировали при 12 500 g в течение 25 мин для определения неосаждаемой активности.

Плавные градиенты плотности сахарозы: 50 мл, плотность 1,10—1,30 г/см³, готовили с использованием смесителя «Ультраград» «ЛКБ» (Швеция). После того как 3 мл фракции λ наслаивали на градиент, пробы центрифугировали в бакетном роторе при 65 000 g в течение 10—14 ч при 4°C. В некоторых экспериментах для изменения плавучей плотности лизосом крысам за 3¹/₂ дня до выделения внутрибрюшинно вводили по 1,5 мл 10% тритона WR-1339 [2].

Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли при 25°C [7]. Активность оксидазы L- α -оксикислот (КФ 1.1.3.1), оксидазы D-аминокислот (КФ 1.4.3.3) [7], уратоксидазы (КФ 1.7.3.3), НАДФ-зависимой изокитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42), цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.2), глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2) [2], лактатдегидрогеназы — ЛДГ (КФ 1.1.1.27) [8], α -глицерофосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.99.5) [9], β -оксибутиратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.30) [10], моноаминоксида-

зы (КФ 1.4.3.1) [11], кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2), β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.20) [12], антимицин нечувствительный (ант.—) НАД·Н цитохром-с-редуктазы (КФ 1.6.2.2) и глюкозо-6-фосфатазы (КФ 3.1.3.9) [13] определяли при 37°C, используя спектрофотометры «Гильфорд-240» (США) либо «Юникам SP-8000» (Англия). Белок определяли по методу Лоури и соавт. [14]. Активность всех исследованных ферментов, за исключением каталазы, выражали в наномолях в минуту использованного субстрата или образовавшегося продукта. Активность каталазы выражали, как описано ранее [15]. При определении общей активности ферментов, за исключением моноаминоксидазы, глюкозо-6-фосфатазы, β -оксибутиратдегидрогеназы и цитохромоксидазы, пробы обрабатывали тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1%. Активность моноаминоксидазы определяли после обработки частиц 2,5% тритоном X-100 [11]. Так как тритон X-100 инактивирует цитохромоксидазу, β -оксибутиратдегидрогеназу и глюкозо-6-фосфатазу, активность этих ферментов определяли после обработки пробы 0,06% дигитонином.

Результаты и обсуждение

Инкубация содержащей митохондрии, лизосомы и пероксисомы фракции λ в 5 мМ трис-ацетатном буфере pH 7,5 при 5°C приводит к значительному возрастанию свободной активности ферментов лизосомального и митохондриального матрикса (рис. 1).

Степень солибилизации исследованных ферментов несколько уступает изменению их свободной активности, однако при увеличении времени инкубации это различие становится менее выраженным. Каталаза пероксисом при использованных условиях инкубации сохраняет латентность на прежнем уровне (см. рис. 1). Скорость освобождения ферментов из лизированных частиц незначительно возраста-

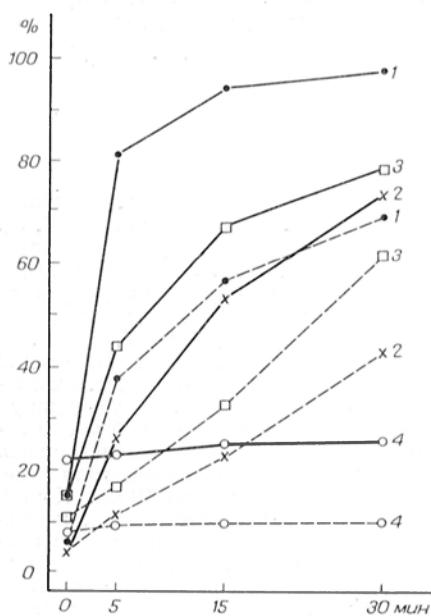


Рис. 1. Влияние гипотонической обработки на свободную и неосаждаемую активность ферментов во фракции λ .

1 — кислая фосфатаза; 2 — глутаматдегидрогеназа; 3 — изоцитратдегидрогеназа; 4 — каталаза. По оси абсцисс — время инкубации в 5 мМ трис-ацетатном буфере, pH 7,0 при 4°C; по оси ординат — свободная (сплошные линии) или неосаждаемая (пунктир) активность ферментов в % от общей в данной пробе.

Условия гипотонической обработки и центрифугирования — см. раздел «Методы исследования».

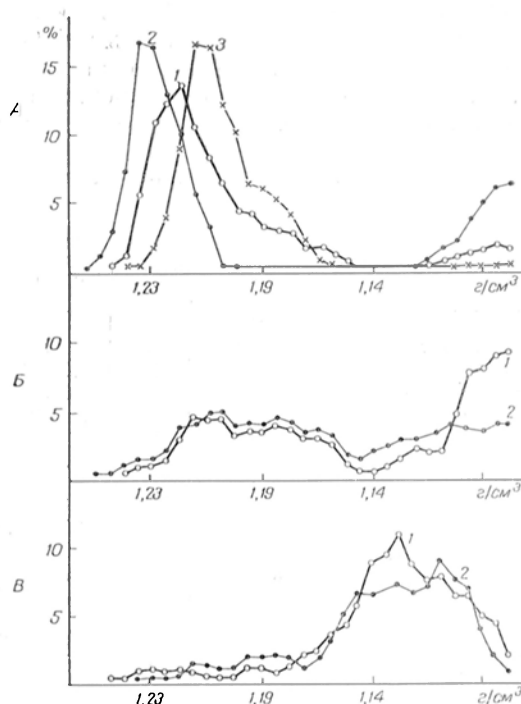
ет при повышении температуры и pH раствора. Однако, как было показано нами ранее [7, 15], изменение этих параметров приводит также к уменьшению устойчивости пероксисомальной мембраны.

Как было обнаружено при центрифугировании фракции λ в плавных градиентах сахарозы, результатом гипотонической обработки является значительное уменьшение плавучей плотности поврежденных лизосом (рис. 2, б) по сравнению с плотностью интактных частиц (рис. 2, а). После осмотического лизиса субклеточных структур в градиенте сахарозы после его фракционирования было выявлено два пика активности кислой фосфатазы и β -глюкозидазы. Такое расположение маркерных ферментов лизосом не является неожиданным, если учесть, что оба эти фермента локализируются в мембране, и в матриксе этих органоидов [16]. Максимум активности, обнаруженный в верхних фракциях градиента, соответствует, по-видимому, растворимой форме ферментов, в то время как широкий пик активности в области с плотностью 1,16—1,20 г/см³ указывает на локализацию поврежденных частиц. Изучение распределения в градиентах сахарозы активности каталазы и цитохромоксидазы не выявило изменений плавучей плотности

пероксисом и поврежденных в результате осмотического лизиса митохондрий. Хотя при гипотонической обработке субклеточных структур не было обнаружено изменения распределения лизосом, аналогичного наблюдаемому при введении животным тритона WR-1339 (рис. 2, в), тем не менее полученное уменьшение плавучей плотности этих органоидов оказалось достаточным для их отделения от пероксисом в градиентах плотности сахарозы. Как

Рис. 2. Изменение седиментационного профиля лизосомальных ферментов при гипотонической обработке фракции λ и при введении животному тритона WR-1339.

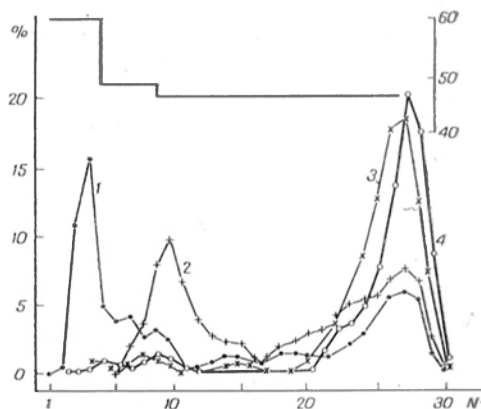
А — распределение в градиенте сахарозы маркерных ферментов пероксисом (1 — каталаза), лизосом (2 — кислая фосфатаза) и митохондрий (3 — цитохромоксидаза) при центрифугировании intactных частиц; Б — седиментационные профили кислой фосфатазы (1) и β -глюкозидазы (2) после гипотонической обработки фракции λ ; В — изменение плавучей плотности лизосом при введении животному тритона WR-1339. 1 — кислая фосфатаза; 2 — β -глюкозидаза. По оси абсцисс — плотность раствора сахарозы (в г/см³); по оси ординат — активность фермента в каждой фракции (в процентах от суммарной активности во всех фракциях).



было установлено в параллельно проведенных экспериментах, применение гипотонической обработки фракции λ при прочих равных условиях повышает чистоту выделяемой фракции пероксисом примерно в 2 раза по сравнению с таковой при очистке, проводимой без использования этой процеду-

Рис. 3. Седиментационные профили маркерных ферментов органоидов при центрифугировании подвергнутой гипотоническому лизису фракции λ в ступенчатом градиенте сахарозы.

1 — каталаза; 2 — цитохромоксидаза, 3 — глюкозо-6-фосфатаза; 4 — кислая фосфатаза. По оси абсцисс — номер фракции, начиная от дна пробирки, всего получали 30 фракций по 1,7 мл каждая; Градиент готовили, как описано в разделе «Методы исследования», и центрифугировали при 65 000 g в течение 5 ч при 4°C. По оси ординат: слева — активность ферментов (в % от суммарной активности во всех фракциях), справа — концентрация сахарозы (в %).



ры. Для отделения пероксисом от поврежденных в результате гипотонического лизиса митохондрий и лизосом нами был использован ступенчатый градиент сахарозы. Как видно из рис. 3, около $\frac{1}{3}$ от общего количества нанесенных на градиент пероксисом располагается между двумя нижними слоями сахарозы. Митохондрии и лизосомы не проникают в эту область градиента. Часть активности маркерных ферментов данных органоидов выявлена на границе слоев 46% и 48% сахарозы. Некоторое количество поврежденных частиц флотирует к поверхности пробирки. Следует отметить,

что выбранные концентрации сахарозы являются оптимальными при данных условиях центрифугирования.

По данным биохимических и морфологических исследований, проведенных независимо друг от друга в нескольких лабораториях [2, 17, 18], содержание пероксисом печени крыс в выделенном препарате можно считать 100% при увеличении удельной активности каталазы и других ферментов матрикса в этом препарате примерно в 36—40 раз по сравнению с активностью в гомогенате. Согласно полученным нами результатам (см. таблицу),

Энзиматическая характеристика фракции очищенных пероксисом

Индикаторный фермент	Число опытов	Удельная активность в гомогенате	Удельная активность в пероксисомах	Относительная активность	Выход во фракции пероксисом, %
Белок, мг/мл	15	23,2±4,0	—	1,0	0,22±0,20
Каталаза	15	0,20±0,06	6,8±2,1	34,0	7,6±3,0
Оксидаза-D-аминокислот	4	4,5±1,3	146±48	32,5	7,9±2,3
Оксидаза L-α-оксикислот	6	19,0±2,6	600±52	31,5	7,5±2,4
Уратоксидаза	11	6,2±1,7	284±56	46,0	8,6±2,7
ЛДГ	4	1520±210	1150±190	0,76	—
α-Глицерофосфатдегидрогеназа	3	44,0	318,0	7,2	—
Изоцитратдегидрогеназа	2	108,0	261,0	2,4	—
Цитохромоксидаза	11	330±110	20±16	0,060	0,030±0,015
Глутаматдегидрогеназа	6	86±42	5,1±1,4	0,059	0,027±0,017
β-оксибутиратдегидрогеназа	4	98±23	6,7±2,6	0,069	—
Моноаминоксидаза	3	5,6±1,6	0,32±0,20	0,057	—
Кислая фосфатаза	9	75,0±19,0	26,0±13,0	0,35	0,085±0,043
β-глюкозидаза	5	6,3±2,6	2,0±0,3	0,32	—
Глюкозо-6-фосфатаза	4	51±21	22±13	0,43	0,097±0,056
НАД·Н-цитохром-с-редуктаза	4	198±36	264±56	1,34	—

Примечание. Активность ферментов выражена в наномолях за 1 мин на 1 мг белка (за исключением каталазы); активность каталазы — в единицах за 1 мин на 1 мг. Выход во фракции пероксисом рассчитан в процентах от общей активности ферментов в гомогенате, прочерк — выход фермента во фракции пероксисом не рассчитывали. За относительную активность принимали отношение удельной активности фермента во фракции пероксисом к его удельной активности в гомогенате.

удельная активность ферментов пероксисомального матрикса возрастает в выделенной фракции в 32—34 раза по сравнению с активностью в гомогенате, что соответствует содержанию пероксисомального белка во фракции в количестве 80—85% [2, 17]. Выход пероксисом составляет 7—8% от их общего содержания в клетках печени. Разработанный метод позволяет получить за одно выделение до 40 мг белка пероксисом.

Из-за разрушения и фрагментации в результате гипотонического лизиса субклеточных структур возникает необходимость более полной энзиматической характеристики фракции пероксисом. В связи с этим для того чтобы избежать недооценки загрязнения выделяемой фракции мембранными компонентами поврежденных лизосом и митохондрий, кроме активности общепринятых маркерных ферментов, расположенных в матриксе этих органоидов (глутаматдегидрогеназа, кислая фосфатаза), исследовали активность ферментов, связанных с их мембраной (цитохромоксидаза, β-оксибутиратдегидрогеназа, моноаминоксидаза, β-глюкозидаза). Существенных различий в активности двух указанных выше групп ферментов в получаемой фракции пероксисом обнаружено не было. Представленные в таблице результаты свидетельствуют о незначительной примеси митохондрий и лизосом, которая в сумме не превышает 5—10% от общего количества белка во фракции [2, 17].

К настоящему времени нет убедительных данных, показывающих идентичность или различие ферментного состава мембран пероксисом и микросом. Имеются указания на присутствие в пероксисомах НАД·Н-цитохром-с-ре-

дуктазы [13], в то время как в отношении глюкозо-6-фосфатазы таких сведений пока нет. Тем не менее, исследование активности глюкозо-6-фосфатазы широко применяется для характеристики чистоты фракции пероксисом [2, 13, 19]. При этом авторы, по-видимому, допускают, что фермент в пероксисомальной мембране отсутствует. Если исходить из данной точки зрения, т. е. предположить, что вся активность глюкозо-6-фосфатазы, выявляемая в пероксисомах, обусловлена микросомальным загрязнением, то, согласно расчетам (см. таблицу), примесь фрагментов эндоплазматического ретикулула составляет не более 10% от общего количества белка фракции [2, 17].

Следует отметить, что получаемая фракция содержит в основном мало поврежденные пероксисомы. Об этом свидетельствует незначительное превышение степени очистки уратоксидазы — фермента пероксисомального пуринолеотида [1, 20] над этим же показателем для ферментов матрикса (см. таблицу), что говорит об отсутствии во фракции большого количества свободных нуклеотидов.

Кроме активности общепринятых маркерных ферментов пероксисом в выделяемой фракции было предпринято исследование активности α -глицерофосфатдегидрогеназы и ЛДГ. Указания о наличии этих ферментов в пероксисомах были получены сравнительно недавно, причем было обнаружено, что в выделяемой фракции содержится только 1,5—2,0% ЛДГ и менее 10% α -глицерофосфатдегидрогеназы от общего их количества в гепатоцитах [8, 9]. Эти результаты наводят на мысль о возможной неспецифической адсорбции ферментов цитозоля на пероксисомальной мембране. Авторы упомянутых выше работ не исключают данного предположения, особенно в отношении ЛДГ. Исследование активности ферментов во фракциях, выделенных различными методами, может дать дополнительные сведения о месте их локализации в клетке. В полученной нами с использованием гипотонической обработки частиц фракции пероксисом была обнаружена высокая удельная активность ЛДГ и α -глицерофосфатдегидрогеназы (см. таблицу), причем соотношение активности этих ферментов и каталазы соответствовало результатам, описанным ранее в литературе [8, 9]. Таким образом, наши данные свидетельствуют в пользу предположения о локализации некоторого количества исследованных ферментов в пероксисомах печени крыс.

Важным преимуществом разработанного метода выделения пероксисом является то, что он позволяет выделять эти органоиды без предварительного введения животному детергента тритона WR-1339. Тем самым создаются условия для получения пероксисом не только из печени, но также из органов, лизосомы в которых не подвергаются действию тритона WR-1339, а также для очистки пероксисом из тканей, измененных патологическим процессом, либо фармакологическим воздействием.

ЛИТЕРАТУРА

1. de Duve Ch., Baudhuin P. — *Physiol. Rev.*, 1966, v. 46, p. 323. —
2. Leighton F., Poole B., Beaufay H. et al. — *J. Cell Biol.*, 1968, v. 37, p. 482. —
3. Scann A., Oriente P. — *J. exp. Med.*, 1961, v. 113, p. 735. —
4. Argilaga C. S., Russell R. L., Heimb erg M. — *Arch. Biochem.*, 1977, v. 178, p. 135. —
5. Baudhuin P. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1969, v. 168, p. 214. —
6. Панченко Л. Ф., Антоненков В. Д., Герасимов А. М. — *Бюлл. exper. биол.*, 1975, № 1, с. 86. —
7. Антоненков В. Д., Герасимов А. М., Панченко Л. Ф. — *Вопр. мед. химии*, 1976, т. 22, с. 522. —
8. McGroarty E., Hsieh B., Wied D. et al. — *Arch. Biochem.*, 1974, v. 161, p. 194. —
9. Gee R., McGroarty E., Hsieh B. et al. — *Ibid.*, p. 187. —
10. Secuzu J., Jurtshu K. P., Green D. E. — *J. biol. Chem.*, 1963, v. 238, p. 975. —
11. Бурсова Л. В., Вьюгова А. А., Горкин В. З. — *Укр. биохим. ж.*, 1965, № 3, с. 463. —
12. Patel V., Tappel A. — *Biochim. biophys. Acta*, 1969, v. 191, p. 86. —
13. Donaldson R. P., Tolbert N. E., Schnarrenberger C. — *Arch. Biochem.*, 1972, v. 152, p. 199. —
14. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 256. —
15. Panchenko L. F., Antonenkov V. D.,

Gerasimov A. M. (Панченко Л. Ф. и др.) — Int. J. Biochem., 1976, v. 7, p. 409. — 16. Hennig R., Kaulep H. D., Stoffel W. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1970, Bd 351, S. 1191. — 17. Арчаков А. И., Панченко Л. Ф., Капитанов А. Б. и др. — Цитология, 1971, т. 13, с. 887. — 18. de Duve Ch. — Harwey Lectures, 1963—1964, ser. 59, p. 49. — 19. Beau-fay H., Ramacle J., Towler St. et al. — J. Cell Biol., 1976, v. 71, p. 551. — 20. Antonenkov V. D., Panchenko L. F. — FEBS Lett., 1978, v. 88, p. 151.

Поступила 22/VI 1978 г.

ENZYMATIC CHARACTERISTICS OF THE PEROXISOME FRACTION, ISOLATED BY HYPOTONIC TREATMENT OF SUBCELLULAR STRUCTURES

L. F. Panchenko, V. D. Antonenkov

Chair of Biochemistry, Medico-Biological Faculty, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

A peroxisome fraction was isolated from rat liver tissue using hypotonic treatment of mitochondria and lysosomes. In the fraction obtained activity of marker enzymes was studied in various subcellular structures. Content of mitochondria, lysosomes and microsomes in the peroxisome fraction was about 15-20% of the total protein in the fraction. The results of hypotonic treatment of lysosomes and mitochondria are considered. Flo-tation activity of lysosomes was decreased to 1.16-1.20 g/cm³ after osmotic lysis and elimination of matrix enzymes from these organelles.

УДК 612.35+612.74]:612.398.145:1

П. И. Фоменко, Л. Б. Ребров

ИЗУЧЕНИЕ ПОСМЕРТНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ СИНТЕЗА РНК В ПЕЧЕНИ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КРЫС

Научно-исследовательская лаборатория биологических структур Министерства здравоохра-
| щения СССР, Москва

При инкубации срезов печени и скелетных мышц крыс в кребс-рингер-буфере pH 7,4, содержащем NaCl, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄, NaHCO₃, глюкозу, нормальную лошадиную сыворотку, пенициллин, гепарин, смесь 20 аминокислот и ¹⁴C-уридин, изучали синтез РНК в указанных тканях в разные сроки посмертного периода. Показана большая скорость посмертной инактивации синтеза РНК в печени по сравнению с мышечной тканью и меньшая стабильность общей эндогенной РНК печени при аутолизе. Отмечается различная динамика распада эндогенной РНК скелетных мышц, взятых в опыт в ранние (6 ч) и поздние (24 ч) сроки посмертного периода и инкубированных в кребс-рингер-буфере. Анализ новообразованной в печени РНК методом диск-электрофореза показал, что при посмертном ингибировании синтеза РНК в первую очередь нарушается синтез высокомолекулярной РНК (28S, 18S) и через 3 ч после смерти животного клетки печени сохраняют способность синтезировать низкомолекулярную РНК.

Для оценки жизнеспособности отдельных органов и тканей после смерти организма и для определения их биологической полноценности в настоящее время предложены различные морфологические, биохимические и функциональные методы или тесты [1—6]. Разработка указанной проблемы, проводимая на органном, тканевом и клеточном уровне, представляется важной и необходимой для практических вопросов консервации, трансплантации, реанимации или судебной медицины. Среди наиболее чувствительных критериев жизнеспособности, кроме определения мембранного потенциала и внутриклеточной концентрации Na⁺ и K⁺, надежным тестом является также включение ¹⁴C-уридина в РНК [7] или ³H- и ¹⁴C-тимидина в ДНК [3, 8] изучаемых органов и тканей. Указанный метод позволяет обнаружить наиболее ранние изменения и повреждения в клетке в посмертном периоде, а также выявить степень и обратимость посмертного прекращения жизненно важных биосинтетических функций клетки [7, 9], т. е. в данном случае позволяет судить о состоянии аппаратов репликации и транскрипции в от-

дельных органах и тканях после смерти целого организма. По нашему мнению, функциональная инактивация различных клеточных биополимеров (ДНК, РНК, белок) в посмертном периоде, проявляющаяся, например, как прекращение биосинтеза нуклеиновых кислот и белка, ингибирование репарационного синтеза ДНК, нарушение функционирования отдельных внутриклеточных структур и органелл, содержащих эти биополимеры, является одним из начальных этапов развития посмертного аутолитического процесса. По-видимому, в дальнейшем функциональная инактивация клеточных биополимеров и структур сменяется или сопровождается их химической деградацией, характеризующей выраженную картину аутолиза и грубые необратимые изменения структуры клетки. Однако в этом отношении данные литературы по изменению содержания РНК и ДНК в органах и тканях в посмертном периоде довольно малочисленны и противоречивы [1, 10—13], что, вероятно, обусловлено различием использованных разными авторами методов анализа нуклеиновых кислот и разными условиями проведения эксперимента.

Целью настоящей работы являлось изучение биосинтеза РНК в печени и скелетных мышцах крыс в разные сроки посмертного периода, а также исследование устойчивости эндогенной РНК указанных тканей к посмертной деструкции.

Методика

Синтез РНК в срезах ткани. В работе использовали белых беспородных крыс массой 150—200 г. Печень и скелетные мышцы задних конечностей брали у крыс немедленно после их забоя и через разные сроки после смерти и помещали ткань в охлажденный до 3°C 0,9% NaCl. До взятия ткани на анализ тушки животных хранили при комнатной температуре. В экспериментах использовали 0,5—1 г сырой ткани. Изготовление срезов тканей (толщина срезов 1—2 мм) проводили вручную с помощью лезвия бритвы, срезы помещали в коническую колбу, содержащую 5 мл крбс-рингера-буфера pH 7,4 (0,9% NaCl, 1,15% KCl, 1,92% CaCl₂, 2,11% KH₂PO₄, 3,82% MgSO₄·7 H₂O, 1,3% NaHCO₃, взятых в соотношении 100 : 4 : 3 : 1 : 1 : 21) [14] с добавлением ¹⁴C-уридина с удельной радиоактивностью 49,3 мКи/ммоль (0,5 мКи на 1 мл среды), глюкозы (1 мг/мл), нормальной лошадиной сыворотки (10%), пенициллина (5000 ЕД/мл), гепарина (10 000 ЕД/мл) и смеси 20 аминокислот (3,2 мг/мл) в соотношении, приближающемся к содержанию аминокислот в крови [15]. В ряде опытов использовали ¹⁴C-уридин с удельной радиоактивностью 0,62 мКи/ммоль. Инкубацию проб проводили при 37°C в течение 1—6 ч при энергичном встряхивании на качалке.

Экстракция и определение РНК. Срезы мышц и печени после инкубации промывали 2 раза холодным 0,9% раствором NaCl и гомогенизировали на холоду в 5 мл 0,2 н. HClO₄ в гомогенизаторе Поттера. Кислотонерастворимый материал собирали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин при 0—3°C, осадок промывали на холоду 3 раза порциями по 5 мл 0,2 н. HClO₄ и после последнего центрифугирования растворяли в 8 мл 0,3 н. КОН. Гидролиз РНК проводили при 37°C в течение 18—24 ч и затем к пробам добавляли избыток 2 н. HClO₄ до конечной концентрации хлорной кислоты 0,2 н. Образовавшийся на холоду осадок удаляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин, а надосадочную жидкость, содержащую гидролизат РНК, использовали для определения количества РНК и подсчета радиоактивности.

Для выделения и изучения суммарной РНК был также использован метод горячей фенольной экстракции [16—18]. Срезы ткани после инкубации промывали холодным 0,9% NaCl и гомогенизировали в смеси равных объемов 90% фенола и водного раствора, содержащего 0,01 М натрий-ацетатный буфер pH 5,1, и 1% додецилсульфат натрия. Отношение массы ткани к общему объему смеси составляло 1 : 20. Затем существенно энергично встряхивали при 60°C в течение 20 мин, быстро охлаждали на ледяной бане и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 мин. Водную фазу собирали и хранили на льду, а к промежуточной фазе добавляли половину объема смеси фенол — натрий-ацетатный буфер — додецилсульфат натрия и проводили дополнительную экстракцию в описанных условиях. После повторного центрифугирования водные фазы объединяли и вновь депротеинизировали фенолом. К полученной водной фазе добавляли 1 М NaCl до конечной концентрации 0,1 М и 2 объема этанола, охлажденного до —20°C. Раствор оставляли на ночь при —10°C. Выпавший осадок собирали центрифугированием на холоду, промывали 3 раза 70% этанолом и растворяли в 0,01 М натрий-ацетатном буфере pH 5,1, содержащем 0,05 М NaCl. Дополнительную очистку РНК проводили с помощью обработки раствора РНК (0,5 мг/мл) 2% суспензией макалоида. Соотношение макалоида и РНК составляло 1 : 100 (по объему). Инкубацию проводили при 4°C в течение 15 мин. Смесь центрифугировали при

5000 об/мин в течение 20 мин, надосадочную жидкость собирали и проводили осаждение РНК этанолом в присутствии 0,1 М NaCl. Переосаждение РНК повторяли еще дважды и препарат РНК до использования в экспериментах хранили под этанолом при -10°C .

Для определения количества РНК в пробах использовали орциновый [16], а также спектрофотометрический методы [19]. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике ЛВАС SL-40 с использованием жидкости Брея [20].

Электрофорез РНК в агарозном геле. Аналитический дисковый электрофорез ^{14}C -РНК проводили в 2% агарозном геле ($9 \times 0,6$ см) по методу Вейля и Хэмпела [21].

В качестве маркера использовали препарат рибосомальной РНК, полученный из скелетных мышц крыс С. С. Шишкиным и соавт. [22] и любезно предоставленный нам авторами. Прээлектрофорез в течение 30 мин и процедуру электрофореза в течение 75—90 мин проводили при комнатной температуре при силе тока 9,1 мА на 1 см^2 поверхности геля. Окраску гелей после электрофореза осуществляли по методу Дальберга [23]. После обесцвечивания гелей в течение ночи в проточной водопроводной воде их разрезали на диски (1—2 мм), растворяли в 30% H_2O_2 при 60°C и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике.

Результаты и обсуждение

В первоначальных опытах при использовании срезов нормальной печени крыс, инкубированных в кребс-рингер-буфере рН 7,4 с ^{14}C -уридином,

была проверена эффективность и пригодность указанной модельной системы для изучения синтеза РНК в нормальных органах и тканях, а также

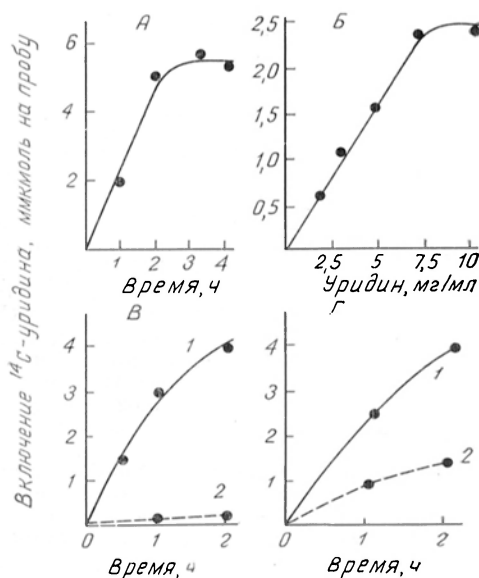


Рис. 1. Включение ^{14}C -уридина в РНК срезов печени крыс в зависимости от времени инкубации (А), концентрации экзогенного уридина (Б), в присутствии актиномицина D (В) и в посмертном периоде (Г).

1 (В, Г) — включение ^{14}C -уридина в РНК срезов нормальной печени; 2 (В) — включение ^{14}C -уридина в РНК мышечной ткани в присутствии актиномицина D; 2 (Г) — включение ^{14}C -уридина в РНК срезов мышц через 12 ч после смерти животного.

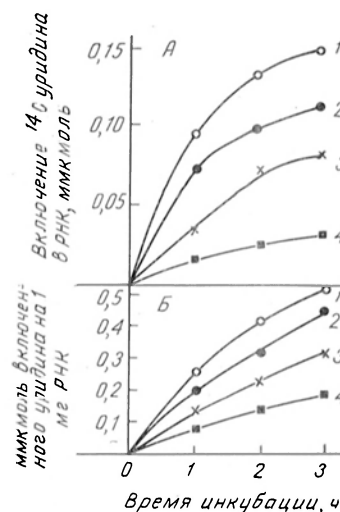


Рис. 2. Включение ^{14}C -уридина в РНК (А) и удельная активность новообразованной РНК (Б) мышечной ткани в норме и в посмертном периоде.

1 — контроль сразу после смерти; 2—4 — соответственно через 6, 12, 24 ч после смерти.

после смерти экспериментального животного. Как видно на рис. 1, А, включение ^{14}C -уридина в кислотонерастворимую фракцию срезов печени крыс имеет линейный характер в течение $1\frac{1}{2}$ ч инкубации, затем включение замедляется и остается на постоянном уровне при инкубации срезов в течение 3—4 ч.

При изучении включения ^{14}C -уридина в кислотонерастворимый материал срезов в зависимости от концентрации этого предшественника (1—10 мг уридина на 1 мл инкубационной среды) было показано, что оптимальная

концентрация экзогенного уридина, при которой наблюдался максимум включения, составляла в указанных условиях 5—7 мг на 1 мл среды (рис. 1, Б). По указанным выше параметрам полученные результаты хорошо совпадали с данными других авторов, изучавших метаболизм экзогенного уридина в срезах печени [24] и синтез РНК *in vitro* в срезах почек крыс [25].

Включение ^{14}C -уридина в кислотонерастворимую фракцию ингибировалось на 96% при добавлении к срезам печени в начале инкубации актиномицина D в концентрации 50 мкг/мл (см. рис. 1, В), что указывало на наличие ДНК-зависимого синтеза РНК в наших экспериментальных условиях при инкубации срезов ткани в кребс-рингер-буфере с ^{14}C -уридином. Все описанные выше результаты опытов, а также обнаружение заметной разницы во включении ^{14}C -уридина в РНК срезов нормальной печени и срезов печени, взятой в опыт через 12 ч после смерти животного (рис. 1, Г), позволили нам в дальнейшем использовать систему срезов ткани для сравнительного изучения синтеза РНК в печени и скелетных мышцах крыс в разные сроки посмертного периода.

В отдельной серии экспериментов была обнаружена различная скорость синтеза РНК в мышцах в зависимости от длительности посмертного

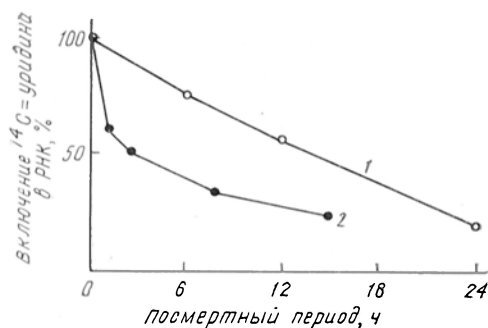


Рис. 3. РНК-синтезирующая активность в мышечной ткани (1) и печени (2) в разные сроки посмертного периода.

Включение ^{14}C -уридина в РНК срезов нормальных тканей за 3 ч инкубации при 37°C в кребс-рингер-буфере принимали за 100%.

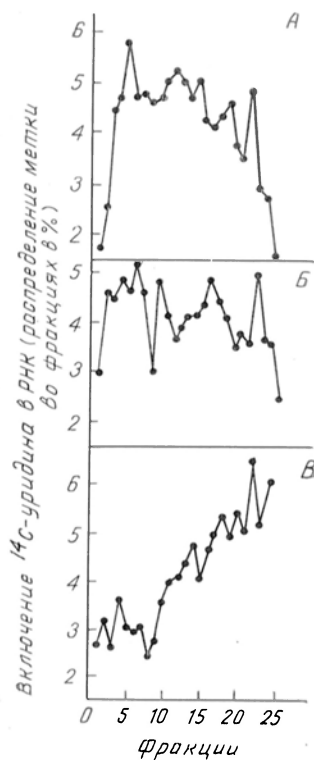


Рис. 4. Электрофоретический профиль РНК, синтезированной в срезах печени и в ранние сроки посмертного периода.

А — контроль; Б — 1 ч посмертного периода; В — 3 ч посмертного периода.

периода (рис. 2). Анализ скорости включения ^{14}C -уридина в РНК и удельной радиоактивности новообразованной РНК в нормальной мышечной ткани (взятой в опыт сразу после забоя животного) и в мышцах через 1—24 ч после смерти и хранения тушки животного при комнатной температуре показал значительное посмертное ингибирование синтеза РНК в ткани. Так, через 6, 12 и 24 ч после смерти в скелетных мышцах сохранялось 75, 53 и 20% РНК-синтезирующей активности соответственно. Вместе с тем результаты сравнительных опытов, проведенных на мышцах и печени крыс, показали, что мышечная ткань обладает более стабильным к действию посмертного аутолиза аппаратом транскрипции по сравнению с паренхиматозными органами. В печени, например, уже через 3 ч после смерти животного уровень РНК-синтезирующей активности составлял 50%, а к 8 ч посмертного

периода включение ^{14}C -уридина в РНК срезов печени снижалось до 30% по сравнению с нормальной тканью (рис. 3).

Таким образом, мышечная ткань и печень различаются между собой по скорости инактивации синтеза РНК в процессе развития посмертного аутолиза. Можно также предполагать, что различная функциональная инактивация РНК (в данном случае инактивация системы синтеза РНК), обнаруженная в печени и мышцах в посмертном периоде, в определенной степени отражает и разную химическую стабильность указанного биополимера в этих тканях животного при посмертном аутолизе.

Действительно, полученные экспериментальные данные указывают, что в ранние сроки посмертного периода отмечается относительная стабильность общей эндогенной РНК мышечной ткани. Количество суммар-

Динамика распада эндогенной РНК мышечной ткани в норме и при аутолизе в условиях инкубации срезов мышц в кребс-рингер-буфере pH 7,4

Время после смерти, ч	Количество эндогенной РНК, мкг на пробу			
	время инкубации срезов мышц, ч			
	0	1	2	3
0	401,7 (100)	369,0 (91,8)	338,0 (84,1)	292,8 (72,7)
6	341,2 (100)	311,6 (91,3)	274,9 (80,5)	254,0 (74,4)
12	338,0 (100)	262,5 (77,7)	260,0 (76,9)	248,0 (73,3)
24	326,2 (100)	200,9 (61,6)	182,0 (55,8)	159,6 (48,0)

Примечание. В скобках указано содержание эндогенной РНК в процентах по отношению к количеству РНК в срезах мышц перед инкубацией, принятому за 100%.

пой РНК в мышцах крыс через 6, 12 и 24 ч после смерти уменьшалось незначительно и составляло 85, 84 и 81% соответственно по сравнению с содержанием РНК в мышцах сразу после забоя животного. В аналогичных условиях эксперимента количество общей эндогенной РНК в печени крыс через 1 ч после смерти составляло 98%, через 3 ч — 65% и через 15 ч — 55%. Сходная динамика изменения содержания РНК в «переживающей» печени крыс (88, 72 и 12% соответственно через 1, 6 и 24 ч после смерти животного) была показана в опытах Ю. М. Лопухина и соавт. [1]. Несколько более высокое значение содержания РНК (32% через 24 ч после смерти) в аутолизирующейся при 37°C печени мыши было получено другими авторами [10]. В целом, однако, можно сделать вывод, что РНК печеночных клеток при аутолизе распадается быстрее, чем РНК мышечной ткани, что, вероятно, можно объяснить как морфологическими особенностями этих тканей, так и разницей в наборе и активности гидролитических ферментов (в данном случае РНК-аз) в печени и мышцах. Наши данные, показывающие относительную стабильность суммарной РНК мышечной ткани на ранних этапах (до 24 ч) посмертного аутолиза хорошо согласуются с результатами С. С. Шишкина и соавт. [22, 26], обнаруживших стабильность рибосомальной РНК и части полисом в мышцах через 72 ч после смерти.

Вместе с тем при инкубации в кребс-рингер-буфере pH 7,4 срезов скелетных мышц, взятых в опыт в разные сроки посмертного периода, в наших опытах была отмечена различная динамика распада эндогенной РНК (см. таблицу).

Как видно из таблицы, в которой представлены результаты типичного эксперимента, при инкубации в течение 1, 2 и 3 ч при 37°C количество эндогенной РНК в срезах нормальных мышц и мышц через 6—12 ч после смерти снижалось на 91, 77—84 и 73—74% соответственно в зависимости от времени инкубации. Однако инкубация срезов мышц животных, хранившихся после смерти при комнатной температуре в течение 24 ч, приводила к рез-

кому снижению содержания эндогенной РНК в мышечной ткани. Так, через 1 ч инкубации количество РНК в срезах составляло только 61 % по отношению к содержанию РНК в срезах мышц перед инкубацией, через 2 ч — 56 % и через 3 ч — 49 %.

На основании полученных результатов можно сделать предположение, что к концу первых суток посмертного периода в мышечной ткани начинают проявляться деструктивные внутриклеточные процессы, возможно, связанные с действием лизосомальных или латентных структурированных гидролаз и обеспечивающие, в частности, большую доступность РНК к действию рибонуклеаз. Указанные процессы сопровождаются прежде всего снижением и прекращением биосинтетических функций клетки, в данном случае — ингибированием синтеза РНК и в дальнейшем по мере развития посмертного аутолиза ведут уже к химической деградации биополимеров, входящих в состав внутриклеточных структур.

На основании результатов сравнительного изучения ингибирования синтеза РНК и стабильности общей РНК в посмертном периоде в исследованных тканях можно также заключить, что при аутолизе сопряженный процесс функциональной инактивации и химической деградации РНК протекает с гораздо большей скоростью в печени по сравнению с мышечной тканью.

В отдельной серии экспериментов при использовании метода аналитического диск-электрофореза в 2% агарозном геле проводили исследование характеристики РНК, синтезированной в срезах печени в ранние сроки посмертного периода. В этих опытах после инкубации срезов ткани, взятой от животного сразу после забоя (контроль) и через 1 и 3 ч после смерти, с ^{14}C -уридином в Krebs-рингер-буфере в течение 2 ч при 37°C проводили выделение и очистку РНК методом горячей фенольной экстракции и анализировали РНК методом высоковольтного диск-электрофореза. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 4.

Используя препарат рибосомальной РНК в качестве маркера при электрофорезе в 2% агарозном геле, первоначально было определено, что фракции геля 4—7, 9—12 и 19—23 соответствуют локализации при электрофорезе 28S, 18S, 4S рРНК соответственно. Распределение метки (^{14}C -РНК) во фракциях агарозного геля показало, что при посмертном ингибировании синтеза РНК в печени в первую очередь нарушается синтез высокомолекулярных типов РНК. Так, общая доля радиоактивности фракций, соответствующих $\geq 30\text{S}$, 28S и 18S синтезированной РНК, снижалась с 57,3% (контроль — 0 ч аутолиза) до 49,1 и 39,0% к 1 и 3 ч аутолиза соответственно. В то же время, как видно на рис. 4, А—В аутолизующаяся печень в течение первых 3 ч после смерти еще сохраняет способность к синтезу низкомолекулярной РНК. При этом количество ^{14}C -РНК, соответствующей фракциям $\leq 4\text{S}$, относительно увеличивалось — с 19,1% (контрольная проба) до 25,4% (1 ч аутолиза) и 33,4% (3 ч аутолиза). В более поздние сроки посмертного периода (15 ч), когда в печени сохраняется меньше 20% РНК-синтезирующей активности, включение ^{14}C -уридина происходит в основном во фракции низкомолекулярной РНК, а доля высокомолекулярной РНК, синтезированной в срезах в указанный срок посмертного периода, резко снижена.

В литературе описан синтез РНК преимущественно с низкой молекулярной массой в изолированных ядрах почек мыши, хранящихся при 37°C в течение 60 мин [27]. Причина снижения молекулярной массы новообразованной РНК в указанных условиях неясна, однако, по мнению этих авторов, обнаруженный факт не обусловлен деградацией синтезированной РНК. По нашему мнению, по-видимому, возможными причинами для объяснения ингибирования синтеза РНК в тканях в раннем посмертном периоде и уменьшения при этом молекулярной массы новообразованной РНК могут быть структурное повреждение молекулы РНК-полимеразы, нарушения в образовании и диссоциации комплекса ДНК—РНК-полиме-

раза или повреждение структуры (фрагментация) самой ДНК-матрицы. Кроме того, посмертное снижение содержания макроэргических соединений и истощение пула нуклеозид-5'-трифосфатов [1] могут также быть причинами прекращения синтеза РНК в тканях в процессе развития посмертного аутолиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лопухин Ю. М., Коган Э. М. Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией. М., 1975. — 2. Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко Н. А. Консервация органов. М., 1975. — 3. Воллина В. В., Юрченко Т. Н. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, 1974, с. 134—136. — 4. Crisp D. M., Pogson C. I. — *Biochem. J.*, 1972, v. 126, p. 1009—1023. — 5. Ross B. D. *Perfusion Techniques in Biochemistry*. Oxford, 1972, p. 190—193. — 6. Dolan M. F. — *Fed. Proc.*, 1965, v. 24, Suppl. 15, p. 275—279. — 7. Baur H., Kaspercek S., Pfaff E. — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1975, Bd 356, S. 827—838. — 8. Van Der Schueren B., Doms D., De Loecker W. — *Cryobiology*, 1974, v. 11, p. 526—535. — 9. Петухова Л. М. — В кн.: Актуальные вопросы современной хирургии. М., 1975, с. 241—245. — 10. Лушников Е. Ф., Шапиро Н. А. Аутолиз. Морфология и механизмы развития. М., 1974. — 11. Berenbom M., Chang J., Betz H. — *Cancer Res.*, 1955, v. 15, p. 1—5. — 12. Stowell R., Chang J., Berenbom M. — *Lab. Invest.*, 1961, v. 10, p. 111—128. — 13. Vendrely R., Alfert M., Matsudaira H. — *Exp. Cell. Res.*, 1958, v. 14, p. 295—300. — 14. Dawson R., Elliot D., Elliot W. et al. — In: *Data for Biochemical Research*. London, 1959, p. 209—210. — 15. John D., Miller L. — *J. biol. Chem.*, 1969, v. 244, p. 6134—6142. — 16. Герогиев Г. П. — В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот. Под ред. И. Б. Збарского и С. С. Дебова. Л., 1968, с. 89—93. — 17. Шеррер К. — В кн.: Методы вирусологии и молекулярной биологии. М., 1972, с. 335—354. — 18. Scherger K., Dagnell J. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1962, v. 7, p. 486. — 495. — 19. Manchester K., Harris E. — *Biochem. J.*, 1968, v. 108, p. 177—183. — 20. Bray L. G. — *Analyt. Biochem.*, 1960, v. 1, p. 279—281. — 21. Weil P., Hampel A. — *Biochemistry (Wash.)*, 1973, v. 12, p. 4361—4367. — 22. Шишкин С. С., Никитина З. К. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 3, с. 346—351. — 23. Dahlberg A., Dingman C., Peacock A. — *J. molec. Biol.*, 1969, v. 41, p. 139—147. — 24. Tseng J., Gurpide E. — *Biochem. biophys. Acta*, 1974, v. 353, p. 399—406. — 25. Thimmaraju B., Bhargava P. — *Indian J. Biochem. Biophys.*, 1971, v. 8, p. 65—71. — 26. Шишкин С. С., Китаевцев Б. А., Дебов С. С. — *Биохимия*, 1975, т. 40, № 5, с. 1053—1059. — 27. Lazarus H., Hopfenbeck A. — *Exp. molec. Path.*, 1975, v. 22, p. 45—54.

Поступила 13/VI 1978 г.

POSTMORTAL INHIBITION OF RNA SYNTHESIS IN RAT LIVER TISSUE AND SKELETAL MUSCLES

P. I. Fomenko, L. B. Rebrov

Research Laboratory of Biological Structures, Ministry of Public Health of the USSR
Moscow

RNA synthesis was studied at various postmortal periods in liver and skeletal muscle slices, incubated in Krebs-Ringer solution (pH 7.4) containing NaCl, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄, NaHCO₃, glucose, normal horse blood serum, penicillin, heparin, mixture of 20 amino acids and ¹⁴C-uridine. The higher rate of postmortal inactivation of RNA synthesis was found in liver tissue as compared to muscles; decreased stability of total endogenous RNA from liver tissue was observed under conditions of autolysis. Various dynamics occurred in dissociation of endogenous RNA from skeletal muscles studied at early (6 hrs) and late (24 hrs) postmortal periods and maintained in Krebs-Ringer solution. As shown by analysis of newly formed RNA from liver tissue using disc electrophoresis, synthesis of high molecular RNA (28 S, 18 S) was primarily impaired in cases of postmortal inhibition of the synthesis; liver cells maintained their capacity for the synthesis of low molecular RNA within 3 hrs after death of the animals.

С. А. Силаева, Н. И. Данилова

ИЗОФЕРМЕНТЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ТИМИДИНКИНАЗЫ ИЗ НОРМАЛЬНОЙ И ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ ТКАНЕЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Кафедра биохимии I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова

Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле исследован состав изоформ тимидинкиназы в субмитохондриальных фракциях тканей печени с разной пролиферативной активностью (интактная, регенерирующая печень и асцитная гепатома Зайделя). Во фракциях цитоплазматических и митохондриальных матриксных белков нормальной и пролиферирующих тканей печени крыс обнаружены три зоны, обладающие активностью тимидинкиназы, которым соответствует электрофоретическая подвижность: I — R_f 0,1—0,2, II — R_f 0,5—0,55, III — R_f 0,85—0,87. Во фракциях наружных и внутренних мембран митохондрий также обнаружены три зоны ферментативной активности, две из которых не совпадают по величине R_f с изоформами тимидинкиназы цитоплазматической фракции и митохондриального матрикса: I — R_f 0,1—0,16, II — R_f 0,35—0,4, III — R_f 0,62—0,68. При переходе печени из состояния покоя к усиленной пролиферации происходит перераспределение ферментативной активности между изоформами тимидинкиназы; возрастает роль медленно мигрирующей формы фермента с R_f 0,1—0,2 в матриксе митохондрий и R_f 0,35—0,4 в мембранных фракциях; соответственно снижается выход тимидинмонофосфата за счет характерных для интактной печени быстро мигрирующих форм фермента с R_f 0,5—0,55 в матриксном содержимом и R_f 0,62—0,68 во фракциях мембран митохондрий.

В условиях стимуляции митотической активности тканей и синтеза ДНК происходит значительная активация синтеза тимидиловых нуклеотидов путем последовательного фосфорилирования эндогенного тимидина за счет тимидин- и тимидилаткиназных реакций.

Тимидинкиназа относится к ряду индуцируемых ферментов синтеза предшественников ДНК. Активность этого фермента тесно коррелирует со скоростью пролиферации тканей [1—5]. Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле [6] в экстрактах пролиферирующих (фетальных и опухолевых) и непролиферирующих (взрослых) тканей были обнаружены две изоформы тимидинкиназы, различающиеся по электрофоретической подвижности молекул, способности к утилизации разных доноров фосфата и реакции на добавки дезоксицитидинтрифосфата. Изоформа тимидинкиназы с R_f равной 0,2, характерна для активно растущих клеток, тогда как в покоящихся тканях присутствовала изоформа фермента с R_f равной 0,5.

В митохондриях животных клеток было найдено несколько изоформ тимидинкиназы, которым присущи разные физико-химические характеристики [7, 8]. Однако изменения в изоферментном составе митохондриальной тимидинкиназы при переходе ткани от состояния покоя к усиленной пролиферации исследованы не были. Для более глубокого изучения изменений в функционировании митохондриальной тимидинкиназы в условиях разной пролиферативной активности нормальной и опухолевой печени крыс в настоящей работе был исследован состав изоформ фермента в субмитохондриальных фракциях тканей с помощью метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле.

Методика

Опыты проводили на крысах-самцах массой 120—150 г. В эксперименте использовали интактную ткань печени крыс, ткань печени крыс через 24 ч после частичной гепатэктомии и суспензию опухолевых клеток асцитной гепатомы Зайделя.

Животных декапировали. Ткань печени извлекали и помещали в охлажденный 0,9% раствор NaCl. Все последующие операции проводили при 0—4°C. Ткань гомогенизировали в 4 объемах буфера А — 0,25 М сахароза, 0,25 М трис-HCl-буфер pH 8,0, 0,025 М KCl, 0,05 М Mg (CH₃COO)₂ — в гомогенизаторе Поттера с тefлоновым пестиком.

Асцитную жидкость асцитной гепатомы Зайделя центрифугировали при 2000 об/мин (800 g) в течение 10 мин. Полученный осадок асцитных клеток 5 раз

отмывали от крови 2-кратным объемом дистиллированной воды с последующим центрифугированием при указанной выше скорости. Затем осадок асцитных клеток суспендировали в 2—3-кратном объеме дистиллированной воды и оставляли на 15 мин во льду. К суспензии клеток после набухания добавляли $\frac{1}{4}$ объема буфера А, в котором содержание всех компонентов было увеличено в 5 раз. Подвергнутые таким образом осмотическому шоку асцитные клетки в дальнейшем разрушали при гомогенизировании в стеклянном гомогенизаторе с плотно притертым тefлоновым пестиком.

Ядра и неразрушенные клетки удаляли центрифугированием гомогената при 600 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость центрифугировали на центрифуге «Spinco» (модель L, ротор 30) при 6500 g в течение 10 мин для осаждения тяжелой митохондриальной фракции по методу Катъера [9]. Митохондрии дважды промывали, ресуспендируя осадки в 0,44 М забуференной сахарозе pH 8,0 с добавлением 1 мМ ЭДТА и осаждавая центрифугированием при той же скорости.

Целость митохондрий контролировали электронно-микроскопическим методом, а степень их загрязнения ядрами, микросомами и лизосомами устанавливали на основании определения ДНК в ядрах и митохондриях по методу Бартон [10], активности глюкозо-6-фосфатазы в митохондриях по методу Свансона [11] и активности кислой фосфатазы по методу Шмидта [12].

Промытые фракции тяжелых митохондрий использовали для получения субмитохондриальных компонентов (наружных, внутренних мембран и матричных белков) по методу Соттокаса [13], включающему процедуру набухания — сморщивания и обработку ультразвуком.

Субмитохондриальные компоненты разделяли центрифугированием разрушенных частиц на центрифуге «Spinco» (модель L2, ротор SW-25) при 25 000 об/мин в течение 2 ч в ступенчатом градиенте 0,75 и 1,32 М сахарозы. Фракция внутренних мембран осаждалась на дно пробирки, фракция наружных мембран задерживалась в зоне градиента 1,32—0,75 М сахарозы, а матрикс оставался в месте нанесения. Зону матричных белков отбирали шприцем и использовали в качестве ферментного препарата. Фракцию наружных мембран отсасывали, разбавляли вдвое 0,01 М трис-HCl-буфером pH 8,0 и осаждали центрифугированием при 105 000 g в течение 30 мин. Осадки внутренних мембран и наружных мембран суспендировали в растворе, содержащем 0,01 М трис-HCl-буфер и 2% тритон X-100, и использовали в качестве ферментных препаратов.

Фракции микросом и цитоплазматических белков получали центрифугированием постмитохондриальной жидкости на центрифуге «Spinco» (модель L2, ротор 40) при 105 000 g в течение 90 мин.

Содержание белка в полученных фракциях определяли по методу Лоури [14]. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили в трубках 0,5×9,5 см в приборе фирмы «Reanal» (Венгрия) при 2—4°C [15] в течение 4 ч при силе тока 3 мА на трубку. Электрофорез проводили в делящем геле следующего состава: 1 часть раствора (48,0 мл 1 н. HCl + 36,6 г трис-буфера + 0,23 мл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина в объеме 100 мл); 2 части раствора (30,0 г акриламида + 0,8 г N,N-метиленбисакриламида в объеме 100 мл); 1 часть раствора (0,2 мМ тимидин + 1,25 мМ MgCl₂); 4 части 0,14% раствора персульфата аммония. Гель дезаэрировали и полимеризовали в течение 20—30 мин при комнатной температуре. На поверхность гелевых столбиков наносили 0,1 мл (0,2—0,3 мг) исследуемого белка в 40% сахарозе, содержащей 1 каплю 0,001% водного раствора бромфенолового синего. Свободный объем трубочек и электрофоретические камеры заполняли электродным буфером. Электродный буфер содержал 5,0 мМ трис-глицин pH 8,3, 1 мМ MgCl₂, 0,2 мМ тимидин, 10 мМ β-меркаптоэтанол [16]. По окончании электрофореза столбики геля извлекали из трубочек, помещали в стеклянные лодочки на полоски ионообменной бумаги DE-81, пропитанной инкубационной смесью для определения активности тимидинкиназы, и инкубировали $1\frac{1}{2}$ ч при 37°C [17]. Затем полосы ионообменной бумаги сушили на воздухе, промывали 0,001 М формиаом аммония pH 3,6, разрезали поперек на секции шириной 0,3 см. Просчитывая адсорбированную на каждой из секций радиоактивность, получали картину расположения зон ферментативной активности в геле.

Результаты и обсуждение

Используя процедуру набухания — сморщивания, обработку ультразвуком и последующее центрифугирование в ступенчатом градиенте плотности сахарозы, фракцию тяжелых митохондрий разделили на субмитохондриальные компоненты — наружные, внутренние мембраны и матричные белки.

С помощью метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле белки субмитохондриальных фракций и цитоплазмы были исследованы на содержание зон, обладающих активностью тимидинкиназы. Как видно на рис. 1 и 2, в интактной, регенерирующей печени и в клетках асцитной гепатомы

Зайделя обнаруживаются три зоны активности тимидинкиназы с электрофоретической подвижностью R_{f_1} 0,1—0,2, R_{f_2} 0,5—0,55 и R_{f_3} 0,85—0,87.

Во фракциях наружных и внутренних мембран митохондрий также имеются три зоны активности тимидинкиназы (рис. 3 и 4), две из которых не совпадают по величине R_f с изоформами тимидинкиназы цитоплазмы и митохондриального матрикса: R_{f_1} 0,12—0,15, R_{f_2} 0,35—0,4 и R_{f_3} 0,62—0,68

На рис. 1—4 и из таблицы видно, что при переходе ткани печени из со-

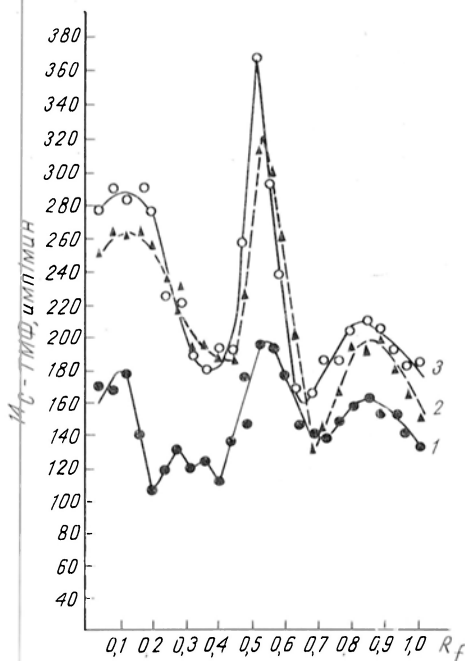


Рис. 1. Электрофоретическая подвижность изоформ тимидинкиназы из интактной (1), регенерирующей (2) печени и асцитной гепатомы Зайделя (3).

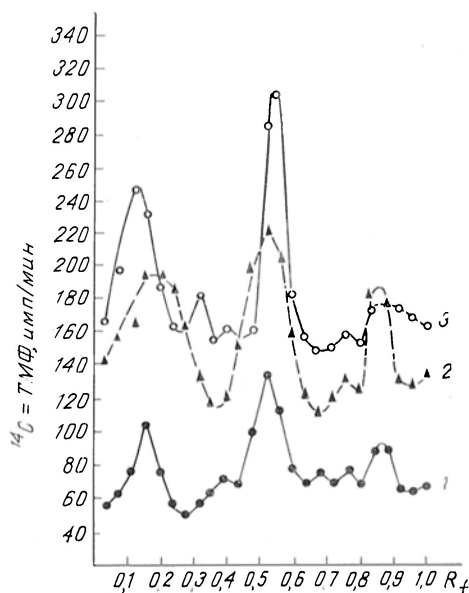


Рис. 2. Электрофоретическая подвижность изоформ тимидинкиназы из фракции матриксных белков митохондрий интактной (1), регенерирующей (2) печени и асцитной гепатомы Зайделя (3).

стояния покоя к пролиферации и интенсивному синтезу ДНК изменения в характере белковых зон, обладающих активностью тимидинкиназы, во всех исследованных фракциях заключаются, во-первых, в повышении уровня ферментативной активности и, во-вторых, в перераспределении активности между отдельными формами тимидинкиназы, о чем можно судить по выходу тимидинмонофосфата (ТМФ), образующегося за счет активности разных изоформ фермента.

Из таблицы видно, что в опытах *in vitro* в цитоплазматической фракции и матриксе митохондрий из интактной печени за счет активности быстро мигрирующей изоформы II (R_f 0,5—0,55) образуется 50—55% от общего количества ТМФ. В процессе регенерации и малигнизации значительно возрастает вклад в синтез ТМФ медленно мигрирующей изоформы I (R_f 0,1—0,2) при соответствующем снижении выхода продукта реакции за счет активности изоформ II и III.

В мембранных фракциях митохондрий покоящейся ткани печени преобладающее количество ТМФ синтезируется за счет активности в основном двух форм тимидинкиназы: III (R_f 0,62—0,68) и I (R_f 0,1—0,16). В регенерирующей печени и асцитной гепатоме Зайделя во фракциях мембран митохондрий наблюдалось перераспределение активности тимидинкиназы между изоформами: увеличивался выход ТМФ за счет активности изоформы I (R_f 0,12—0,15) и в несколько меньшей степени за счет изоформы II

(R_f 0,32—0,38), а вклад изоформы III (R_f 0,62—0,68) в синтез ТМФ соответственно уменьшался. Некоторое отклонение от этого наблюдалось в соотношении изоформ тимидинкиназы во фракции внутренних мембран митохондрий асцитной гепатомы Зайделя, в которых более 70% от синтезируемого ТМФ образовалось за счет приблизительно равной фермента-

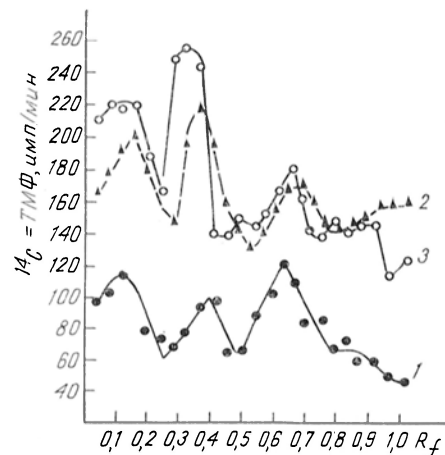


Рис. 3. Электрофоретическая подвижность изоформ тимидинкиназы из фракции наружных мембран митохондрий интактной (1), регенерирующей (2) печени и асцитной гепатомы Зайделя (3).

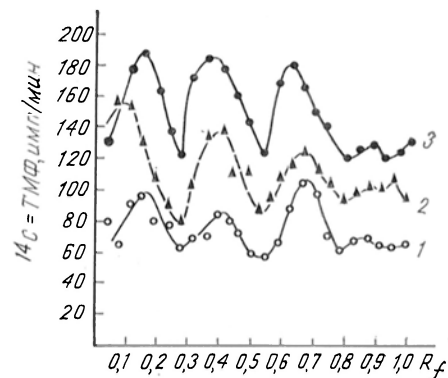


Рис. 4. Электрофоретическая подвижность изоформ тимидинкиназы из фракции внутренних мембран митохондрий интактной (1), регенерирующей (2) печени и асцитной гепатомы Зайделя (3).

тивной активности изоформ II (R_f 0,38—0,4) — 39% и I (R_f 0,1—0,16) — 35%. Следует отметить что во всех фракциях митохондрий и цитоплазматических белков изоформы тимидинкиназы из клеток асцитной гепатомы Зайделя по составу и электрофоретической подвижности не отличаются от изоформ нормальных тканей.

Количественный выход ТМФ (в %), образующегося за счет разных изоферментов тимидинкиназы из интактной, регенерирующей и опухолевой ткани печени крыс

Фракция	R_f изоформ	Интактная печень	Регенерирующая печень	Асцитная гепатома Зайделя
Цитоплазматическая:				
I	0,4—0,14	30	53	54
II	0,5—0,54	50	36	38
III	0,85—0,87	20	11	8
Матрикс митохондрий:				
I	0,14—0,2	25	44	40
II	0,52—0,55	55	43	50
III	0,85—0,87	20	13	10
Наружные мембраны митохондрий:				
I	0,12—0,15	37	43	49
II	0,35—0,38	19	40	42
III	0,62—0,65	44	17	9
Внутренние мембраны митохондрий:				
I	0,1—0,16	35	48	33
II	0,38—0,4	23	30	39
III	0,62—0,68	42	22	28

Основная часть активности митохондриального фермента сосредоточена в матриксном содержимом [8, 18]. Профиль электрофореграмм активности тимидинкиназы в цитоплазме и матриксе митохондрий почти одина-

ков не только в нормальной, но и в быстрорастущей ткани печени, что, по-видимому, свидетельствует о цитоплазматическом происхождении тимидинкиназы в матриксе митохондрий.

Изоформа I (R_f 0,12—0,15) тимидинкиназы во фракции цитоплазматических белков присутствует также на электрофореграммах активности тимидинкиназы мембранных фракций митохондрий и является, по-видимому, цитозольподобной формой фермента.

Мембранные изоформы тимидинкиназы — II (R_f 0,32—0,4) и III (R_f 0,62—0,68) — являются специфичными для митохондрий изоферментами. Возможно, это собственно митохондриальные изоформы тимидинкиназы, которые синтезируются клеткой только для митохондрий, либо это те же образующиеся в цитоплазме изоформы фермента, но претерпевшие изменения в связи с особенностями их функционирования в митохондриальных мембранах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hwang K. M., Murphree S. A. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1974, v. 366, p. 143—148.
2. Bello L. J. — *Exp. Cell Res.*, 1974, v. 89, p. 263—274.
3. Ольшанецкая А. Д., Новикова М. А. — *Вопр. онкол.*, 1968, в. 17, 70—75.
4. Elford H. L. — *Advanc. Enzym. Regulat.*, 1972, v. 10, p. 19—24.
5. Slaty J., Skoog L., Thelander L. — *Europ. J. Biochem.*, 1971, v. 21, p. 279—286.
6. Adler K., McAuslan B. R. — *Cell*, 1974, v. 2, p. 113—117.
7. Kit S., Leung W. C., Trkula D. et al. — *Arch. Biochem.*, 1975, v. 169, p. 66—76.
8. Kit S., Leung W. C., Kaplan L. A. — *Europ. J. Biochem.*, 1973, v. 39, p. 43—48.
9. Katjare S. S., Fatterparker P. et al. — *Biochem. J.*, 1970, v. 118, p. 111—117.
10. Burton K. — *Ibid.*, 1956, v. 62, p. 315—321.
11. Swanson M. A. — *Meth. Enzymol.*, 1955, v. 2, p. 541—544.
12. Schmidt G. — *Ibid.*, p. 523—528.
13. Sottocasa G. L., Kuylenstierna B. et al. — *Ibid.*, 1967, v. 10, p. 448—456.
14. Lowry O. H. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265—275.
15. Майер Г. — *Диск-электрофорез*, М., 1971.
16. Kit S., Leung W. C. — *Biochem. Genet.*, 1974, v. 11, p. 231—247.
17. Мунуон W., Buchbaum R. — *Virology*, 1972, v. 49, p. 683—689.
18. Силаева С. А., Ветрова Е. Г., Данилова Н. И. и др. — *Биохимия*, 1976, т. 41, с. 1367—1362.

Поступила 15/VI 1978 г.

ISOENZYMES OF MITOCHONDRIAL THYMIDINE KINASE FROM NORMAL AND PROLIFERATING RAT LIVER TISSUES

S. A. Silaeva, N. I. Danilova

Chair of Biochemistry, I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

Isoenzyme composition of thymidine kinase was studied in submitochondrial fractions of liver tissue with various proliferative activity (intact, regenerating livers and Zhaidel ascites hepatoma) using polyacrylamide gel disc electrophoresis. Three zones, corresponding to proteins with R_f 0.1-0.2 (I), R_f 0.5-0.55 (II) and R_f 0.85-0.87 (III) and exhibiting thymidine kinase activity, were found in fractions of cytoplasmic and mitochondrial matrix proteins from resting and proliferating rat liver tissues. In fractions of outer and inner mitochondrial membranes three zones of the enzymatic activity were also observed but two of them did not coincide in the R_f value with the thymidine kinase isoenzymes from cytoplasmic fraction and mitochondrial matrix: I R_f 0.1-0.16, II R_f 0.35-0.4 and III R_f 0.62-0.68. Redistribution of the enzymatic activity between thymidine kinase isozymes occurred in conversion of liver tissue from the resting state to increased proliferation. In these cases slowly migrating enzymatic fraction (R_f 0.1-0.2) was activated in mitochondrial matrix and membranes; formation of TMP, catalyzed by isozymes with fast mobility (R_f 0.5-0.55 in matrix and R_f 0.62-0.68 in membrane fractions of mitochondria), which are typical for intact liver tissue, was decreased, respectively.

В. М. Плесков, И. Л. Саакян, Ю. Л. Житнухин

ИНДУКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ЭНЦЕФАЛИТОГЕННЫМИ БЕЛКАМИ МИЕЛИНА ИЗ СПИННОГО МОЗГА БЫКА

Отдел биохимии липидов и атеросклероза им. Н. И. Аничкова, отдел микробиологии и иммунологии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Методом хроматографии на колонке из спинного мозга быка выделен в гомогенном виде основной белок, обладающий высокой энцефалитогенной активностью в отношении морских свинок и кроликов. Инюкуляция последним выделенного препарата в смеси со стимулятором Фрейнда приводила к развитию неврологических симптомов ЭАЭ и очагов демиелинизации как в спинном, так и в головном мозге животных.

Многочисленными исследованиями установлено, что энцефалитогенность миеллина ЦНС обусловлена содержащимся в нем основным белком, который был выделен, охарактеризован и использован для воспроизведения экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) у животных [1]. Показано, что в растворе этот белок имеет открытую структуру и по некоторым параметрам сходен с гистонами, но содержит большее количество гистидина и пролина [2, 3]. Как оказалось, энцефалитогенность основного белка для морских свинок и кроликов зависит от наличия в его молекуле триптофана, глутамина и лизина [4, 5]. В то же время полипептид, выделенный из смеси основных белков и состоящий из 45 аминокислот, несмотря на отсутствие в его аминокислотной последовательности триптофана, вызывал развитие ЭАЭ у кроликов и обезьян, что может свидетельствовать о наличии в структуре белка нескольких энцефалитогенных детерминант [6, 7].

Целью настоящей работы явилось выяснение характера и локализации очагов демиелинизации в ЦНС кроликов при введении им очищенных энцефалитогенных полипептидов.

Методы исследования

Для препаративного выделения основных белков в настоящей работе использовали КМ-сефадекс С-25 и G-50 (фирма «Фармация», Швеция). Спинной мозг быка (500 г) размельчали в механическом гомогенизаторе с 1 л ацетона и петролейного эфира в течение 15 мин; осадок высушивали в эксикаторе над силикагелем. Из 30 г полученного таким образом порошка экстрагировали белки 0,02 н. HCl; экстракт смешивали с заряженной формой КМ-сефадекса С-25, промывали несколько раз дистиллированной водой для удаления нейтральных и кислых белков и упаковывали в хроматографическую колонку размером 3,5×60 см. Колонку промывали дистиллированной водой (500 мл) и 0,1 н. HCl (1500 мл), элюируя смесь основных белков. Осаждение белков из элюата осуществляли 10-кратным объемом ацетона. Полученный осадок растворяли в смеси муравьиная кислота — уксусная кислота — вода в соотношении 1 : 4 : 4,5 и наносили на хроматографическую колонку с сефадексом G-50, уравновешенную тем же раствором. Белковый состав полученных фракций изучали с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и рехроматографии на колонке с сефадексом G-50. Аминокислотный состав энцефалитогенных полипептидов определяли в аминокислотном анализаторе фирмы «Хитачи». ЭАЭ у морских свинок и кроликов вызывали однократной подкожной (в подушечки лап) инъекцией энцефалитогенных препаратов, растворенных в 0,1 или 0,2 мл физиологического раствора и смешанных с 0,3 или 0,6 мл полного адьюванта Фрейнда, содержащего 5 мг/мл сухих убитых туберкулезных микобактерий. Животных наблюдали ежедневно для своевременного выявления неврологических симптомов ЭАЭ. В разные сроки после сенсибилизации животных забивали для извлечения головного и спинного мозга с целью изучения гистологических изменений в ЦНС.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена автоматическая запись элюции белков с колонки, заполненной КМ-сефадексом С-25 при обработке ее сначала дистилли-

рванной водой, а затем 0,1 н. HCl. Как видно, белки элюировались с колонки в виде нескольких пиков. Первый пик содержал нейтральные и кислые белки, не связанные с ионообменником и легко элюируемые с колонки дистиллированной водой. В состав фракций 2, 3 и 4 входили основные белки, так как они элюировались с колонки 0,1 н. HCl. Необходимо отметить,

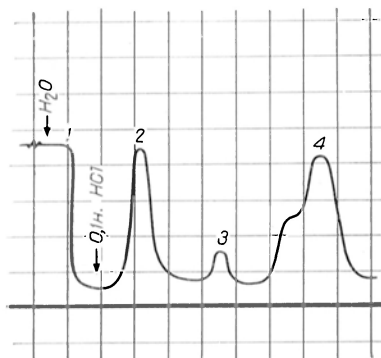


Рис. 1. Хроматография кислотного экстракта спинного мозга быка на КМ сефадексе С-25.

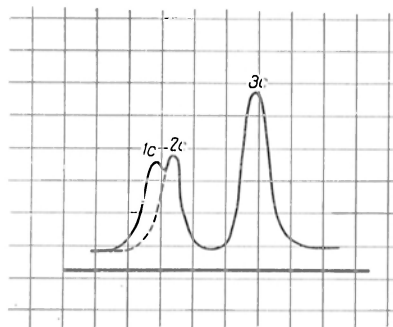


Рис. 2. Автоматическая запись выхода белка с сефадекса G-50 на ленте самописца «Увикорд», настроенного на длину волны 255 нМ.

Скорость движения ленты прибора 2 см/ч, скорость элюции — 30 мл/ч. 1с, 2с, 3с — белковые фракции.

что энцефалитогенной активностью обладала только фракция 4, которая и была использована в дальнейшем для разделения смеси основных белков на полипептиды с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-50 (рис. 2). Полученные фракции 1с, 2с и 3с были лиофилизированы и оттитрованы на морских свинках. Установлено, что фракция 1с обладала выраженной энцефалитогенной активностью в отношении морских свинок в дозах от 1 до 0,01 мг препарата на одно

Аминокислотный состав (в мкмольях на 1 мг белка) энцефалитогенных белковых фракций из спинного мозга быка

Аминокислота	Содержание аминокислот во фракции	
	1 с	2 с
Лизин	0,31	0,76
Гистидин	0,37	0,32
NH ₃	3,2	0,23
Аргинин	0,9	0,14
Аспарагиновая	0,7	1,09
Треонин	0,6	0,27
Серин	0,5	0,59
Глутаминовая	1,0	0,47
Пролин	1,3	0,25
Глицин	1,4	0,71
Аланин	0,9	0,32
Валин	0,3	0,08
Метионин	0,1	0,013
Изолейцин	0,5	0,24
Лейцин	0,6	0,29
Тирозин	0,2	0,09
Фенилаланин	0,5	0,000

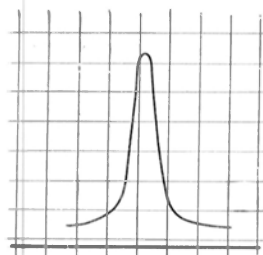


Рис. 4. Рехроматография фракции 2с на колонке с сефадексом G-50. Автоматическая запись на ленте самописца «Увикорд». Скорость движения ленты прибора 2 см/ч, скорость элюции 2 мл/ч.

животное, сохраняя это свойство при снижении дозы до 1 мкг. Столь же высокой энцефалитогенной активностью обладала и фракция 2с, в связи с чем эти две фракции и были использованы для дальнейших исследований.

На рис. 3 см. на вклейку показаны результаты электрофоретического разделения белков в ПААГ. Можно видеть, что белок фракции 2с при элект-

рофореze в ПААГ давал только одну окрашенную амидо черным зону, что в определенной степени свидетельствовало о его гомогенности. Гомогенность этой фракции была установлена также с помощью рехроматографии исследуемого белка на хроматографической колонке с сефадексом G-50 (рис. 4).

Таким образом, из спинного мозга быка был выделен в гомогенном виде основной белок и исследован его аминокислотный состав (см. таблицу).

Фракции 1с и 2с различались между собой по аминокислотному составу. Лишь содержание гистидина и серина в указанных препаратах было сопоставимым (0,37 и 0,32 мкмоль на 1 мг белка). Однако, несмотря на существенные различия в аминокислотном составе, выделенные полипептид-

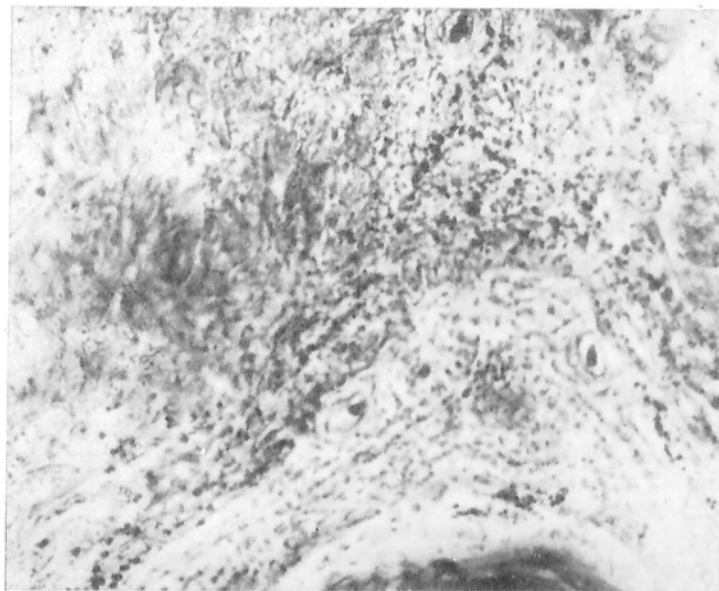


Рис. 5. Распад миелина в пирамидных трактах продолговатого мозга кролика при ЭАЭ.
Метод Марки. Ув. 100.

ные фракции 1с и 2с обладали выраженной энцефалитогенной активностью и введение белка этих фракций в смеси со стимулятором Фрейнда кроликам вызывало у последних однотипные по характеру и локализации повреждения ЦНС (рис. 5). На основании полученных данных можно прийти к выводу, что количественное соотношение аминокислот в молекуле полипептидов не является определяющим фактором в отношении энцефалитогенных свойств молекулы, а эти свойства детерминированы первичной структурой. Следует также отметить, что аминокислотный состав выделенных нами полипептидов отличался от такового у препаратов, полученных другими авторами [8].

Клинические признаки ЭАЭ у кроликов появлялись, как правило, на 12—14-й день после инокуляции полипептидов фракций 1с или 2с, т. е. раньше, чем у животных, сенсибилизированных гомогенатами тканей ЦНС или препаратами очищенного миелина (12—21-й день). Заболевание протекало остро и выражалось в расстройстве координации движений, нарушении функции тазовых органов, развитии парезов, параличей конечностей и т. д.

Весьма интересными представляются результаты морфологических исследований ЦНС кроликов с ЭАЭ. Ранее было показано, что при введении животным энцефалитогенной смеси из гомогенатов гомологичного, гетерологичного мозга или препарата очищенного миелина демиелинизация в

головном мозге отмечалась сравнительно редко или почти отсутствовала [9]. В то же время морфологические исследования ЦНС кроликов с неврологическими проявлениями ЭАЭ, развившегося в результате введения им выделенных полипептидов в смеси со стимулятором Фрейнда, выявили распад миелиновых оболочек на всех уровнях спинного мозга и, что особенно следует подчеркнуть, у подавляющего большинства животных — в белом веществе различных образований головного мозга. На рис. 5 отчетливо виден распад миелина в пирамидных путях продолговатого мозга, выявленный с помощью метода Марки.

Таким образом, инокуляция кроликам основного белка из спинного мозга быка приводила к появлению у животных очагов демиелинизации не только в спинном, но и в головном мозге. При этом обращал на себя внимание факт нарушения трофики тканей внутренних органов, в частности желудка, выражающегося в резкой его атонии и образовании трофических язв слизистой оболочки, проникающих в мышечный слой. Это дает основание рассматривать кроликов с ЭАЭ как в достаточной степени адекватную модель для изучения нарушений обмена гладкой мышцы желудка с нарушенной нервной трофикой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lumsden C. E., Robertson D. M., Blight R. — J. Neurochem., 1966, v. 13, p. 127. — 2. Korneguth S. E., Kozell L. R., Smithies O. — Nature, New Biol., 1972, v. 237, p. 49. — 3. Eylar E. H., Thompson M. — Arch. Biochem., 1969, v. 129, p. 468. — 4. Chao L. P., Einstein E. — J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 6397. — 5. Lennon V. A., Wilks A. V., Carnegie P. R. — J. Immunol., 1970, v. 105, p. 1223. — 6. Kibler R., McKnelly J., Shapira R. et al. — Science, 1969, v. 164, p. 577. — 7. Kibler R., McKnelly J. — J. Biol. Chem., 1972, v. 247, p. 969. — 8. Brostoff S. W., Sacks H., Canto M. D. et al. — J. Neurochem., 1974, v. 23, p. 1037. — 9. Жаботинский Ю. М., Иоффе В. И. — Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы. Л., 1975, с. 158.

Поступила 28/VI 1978 г.

INDUCTION OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS BY ENCEPHALITOGENIC PROTEIN OF MYELIN FROM BOVINE SPINAL CORD

V. M. Pleskov, I. A. Saakyan, Yu. L. Zhitnukhin

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

A homogenous base protein, exhibiting high encephalitogenic activity towards guinea pigs and rabbits, was isolated from bovine spinal cord using column chromatography. Administration of the preparation obtained together with Freund's adjuvant into the animals caused development of neurologic symptoms typical for experimental allergic encephalomyelitis as well as formation of demyelination foci both in spinal cord and in brain of guinea pigs and rabbits.

УДК 616.71-008.9-02:616.71-001.5-089.84

В. Н. Матвеевко, В. К. Камерин, А. Н. Гайдамак, Ю. П. Балдин

МУКОПОЛИСАХАРИДЫ, КОЛЛАГЕН И КАЛЬЦИЙ КОСТНОГО РЕГЕНЕРАТА ПРИ ЗАМЕЩЕНИИ ДЕФЕКТА КОСТИ МЕТОДОМ МОНОЛОКАЛЬНОГО КОМПРЕССИОННО-ДИСТРАКЦИОННОГО ОСТЕОСИНТЕЗА

Лабораторно-экспериментальный отдел Курганского научно-исследовательского института экспериментальной и клинической ортопедии и травматологии

В регенерате, образующемся при компрессионно-дистракционном остеосинтезе, осуществляется интенсивный синтез коллагена, составляющего основу органического матрикса костной ткани. Органическая основа регенерата быстро минерализуется

и после прекращения дистракции содержит более половины уровня кальция в зрелой кости здоровых животных. Накопление мукополисахаридов в регенерате является сравнительно невысоким, что, очевидно, связано с благоприятными условиями для формирования его кровоснабжения при стабильной фиксации отломков.

Широко используемый в ортопедии и травматологии метод компрессионно-дистракционного остеосинтеза [1, 2] позволяет устранять значительные укорочения и деформации конечностей. Формирование и созревание костного регенерата, образующегося при дистракции, отличаются от обычного заживления переломов костей как длительностью репаративного процесса, так и динамикой количественных и качественных изменений химического состава в различные периоды его созревания.

Настоящая работа посвящена изучению содержания некоторых характерных для костного матрикса химических соединений (мукополисахаридов, коллагена и кальция) в процессе формирования дистракционного регенерата при замещении дефекта диафиза костей голени.

М е т о д и к а

Эксперимент проведен на 19 взрослых собаках, которым под внутривенным тиопенталовым наркозом создавали дефект диафиза берцовых костей протяженностью 20—30 мм, что составляло 20—30% от длины голени. На голень накладывали аппарат Илизарова из 4 колец, концы фрагментов сближали и между ними создавали условия компрессии, продолжавшейся в течение 7 сут. С 8-го дня осуществляли дозированную дистракцию по 0,75 мм в сутки до полного восстановления первоначальной длины сегмента, а затем производилась фиксация аппаратом. После фиксации аппарат снимали и животные находились в опыте в течение месяца. Биохимические исследования формирующегося регенерата были проведены после окончания дистракции (7 собак), после фиксации аппаратом в течение 3 нед (7 собак) и через 1 мес после снятия аппарата при 8-недельной фиксации (5 собак). Анализ подвергали и объединенные проксимальный и дистальный участки большеберцовой кости шириной 2—3 мм, непосредственно прилегающие к регенерату. С целью получения информации о реакции скелета на замещение дефекта конечности были исследованы соответствующие участки большеберцовой кости интактной конечности. Для получения показателей, характеризующих кость здоровых животных, использовали резецированные во время операции фрагменты костей голени. Освобождение костей и регенерата от мягких тканей проводили методом папаинового протеолиза [3], обезжиривали ацетоном и эфиром и высушивали до постоянного веса. Часть минерала сжигали в концентрированной серной кислоте с катализатором для последующего определения кальция [4]. В тканях определяли содержание коллагена по оксипролину [5], уроновых [6] и сиаловых кислот [7] и гексозаминов [8].

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

Данные о содержании углеводов в дистракционном регенерате на разных стадиях замещения дефекта большеберцовой кости представлены в табл. 1. Содержание уроновых кислот в регенерате после дистракции выше, чем в костях здоровых животных, и продолжает оставаться высоким после 3 нед фиксации. Содержание сиаловых кислот и гексозаминов в регенерате, образовавшемся при дистракции, также более чем в $1\frac{1}{2}$ раза выше, чем в кости здоровых животных, и незначительно изменяется после прекращения дистракции. Содержание уроновых и сиаловых кислот, а также гексозаминов в участках костей, прилегающих к регенерату, также увеличивается в соответствии с повышением их содержания в регенерате, однако в несколько меньшей степени.

Исследование фрагментов берцовых костей интактной конечности показало, что содержание мукополисахаридов в них после дистракции повышается незначительно — примерно на 10% (табл. 2). Уровень коллагена во все периоды формирования регенерата лишь незначительно ниже, чем в костях контрольных животных (см. табл. 1).

Наряду с увеличением количества мукополисахаридов в регенерате отмечены изменения в содержании кальция в разные сроки наблюдения. В регенерате после дистракции обнаруживается примерно 53% от коли-

чества минералов, содержащихся в костях здоровых животных. В процессе последующей фиксации происходит постепенное накопление кальция, содержание которого в течение всего периода наблюдения, однако, не достигает такового в зрелой кости. Количество кальция в участках кости, прилегающих к регенерату в период distraction, уменьшается по сравнению с контролем, а в период фиксации происходит его медленное накопление. Количество кальция и коллагена в большеберцовой кости интактных конечностей существенно не изменялось в течение всего эксперимента (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 1

Изменение содержания органических соединений и кальция в distractionном регенерате ($M \pm m$)

Биохимические компоненты кости	Контроль	Срок исследования		
		после distraction	после 3 нед фиксации	после снятия аппарата
Уроновые кислоты, мг на 100 г ткани	92,0 \pm 1,69	121 \pm 6,9 $P < 0,001$	124 \pm 3,84 $P < 0,001$	—
Сialовые кислоты, мг на 100 г ткани	19,4 \pm 0,86	32,8 \pm 4,34 $P < 0,01$	33,8 \pm 1,22 $P < 0,001$	40,2 \pm 3,45 $P < 0,001$
Гексозамины, мг на 100 г ткани	156 \pm 4,75	235 \pm 7,36 $P < 0,001$	—	233 \pm 3,7 $P < 0,001$
Коллаген (оксипролин), г на 100 г ткани	2,91 \pm 0,16	2,77 \pm 0,20 $P > 0,1$	2,39 \pm 0,22 $P > 0,05$	2,93 \pm 0,09 $P > 0,1$
Кальций, г на 100 г ткани	26,9 \pm 0,49	14,2 \pm 0,78 $P < 0,001$	17,4 \pm 2,88 $P < 0,001$	21,2 \pm 0,22 $P < 0,001$

При исследовании регенерата после переломов длинных трубчатых костей были выявлены закономерные изменения в содержании органических веществ костного матрикса и, в частности, углеводосодержащих белков [9]. В начальной стадии регенерации происходит их накопление. Далее их количество постепенно уменьшается, качественные соотношения изменяются [10, 11].

Т а б л и ц а 2

Изменение содержания органических соединений и кальция в интактных костях по сравнению с таковым в костях здоровых животных

Биохимические компоненты кости	Срок исследования		
	после distraction	после 3 нед фиксации	после снятия аппарата
Уроновые кислоты, мг на 100 г ткани	101,74 \pm 4,61 $P < 0,02$	100,4 \pm 4,35 $P < 0,05$	—
Сialовые кислоты, мг на 100 г ткани	21,8 \pm 1,3 $P > 0,1$	22,33 \pm 1,4 $P > 0,05$	23,2 \pm 2,33 $P > 0,1$
Гексозамины, мг на 100 г ткани	173,0 \pm 19,0 $P > 0,1$	179,0 \pm 4,59 $P < 0,01$	182,5 \pm 7,59 $P < 0,01$
Кальций, г на 100 г ткани	26,80 \pm 0,92 $P > 0,1$	25,64 \pm 1,63 $P > 0,1$	26,00 \pm 1,22 $P > 0,1$

В наших экспериментах также было установлено увеличение содержания мукополисахаридов в регенерате, образующемся при замещении дефекта кости компрессионно-distractionным остеосинтезом. Однако этот процесс был выражен меньше, чем при заживлении переломов у животных, которым производили нестабильную фиксацию отломков [12, 13].

Важным фактором, влияющим на содержание мукополисахаридов, является формирование кровоснабжения регенерата. Мукополисахариды накапливаются в большом количестве при плохо развитой капиллярной сети [14]. При стабильной фиксации отломков создаются оптимальные усло-

вия для восстановления нарушенного местного кровообращения и отмечается минимальная продолжительность репаративного цикла с образованием регенерата малого объема [15]. В то же время при нестабильной фиксации вторичное повреждение путей циркуляции крови приводит к увеличению продолжительности репаративной реакции и к увеличению объема регенерата. Пролиферация клеток костной ткани ростковой зоны стимулируется гипоксией [16].

Исследования Г. А. Илизарова и соавт. [17], Г. И. Лаврищевой и В. П. Штина [18] показывают, что в регенерате в ходе distraction по методу Г. А. Илизарова формируется большое количество продольно ориентированных капилляров, что свидетельствует об усиленной циркуляции крови и указывает на интенсивность обмена в зоне остеогенеза. Следовательно, умеренное повышение содержания мукополисахаридов в регенерате при distraction можно объяснить благоприятными биомеханическими условиями для формирования кровообращения в регенерате.

Во время фиксации содержание мукополисахаридов в регенерате остается на прежнем уровне, что указывает на перестройку регенерата, необходимую для его «химического созревания». Наиболее значительная перестройка происходит после снятия аппарата, когда возрастает нагрузка на регенерат и изменяются условия его кровоснабжения и, очевидно, поэтому содержание мукополисахаридов не снижается.

Некоторое повышение содержания мукополисахаридов в костях интактной конечности указывает, что имеет место определенная корреляция процессов биохимической перестройки как в регенерате, так и в отдаленных от места повреждения участках кости.

Формирование регенерата при distraction сопровождается интенсификацией синтеза коллагена. Содержание коллагена в регенерате и прилегающих к нему участках кости, как показывает определение оксипролина, лишь незначительно ниже, чем в костях здоровых животных, а также в костях неоперированной конечности в период distraction и фиксации, и через месяц после снятия аппарата достигает этого уровня.

Данные об изменении содержания кальция в регенерате кости указывают, что после завершения формирования органической стромы последняя минерализуется довольно быстро. Содержание кальция в регенерате в конце distraction составляет 53% от такового в зрелой кости, а в конце исследования достигает 79%. Предполагается, что области нуклеации апатита обеспечивают коллаген, а мукополисахариды основного вещества могут тормозить кальцификацию [19]. В наших экспериментах обнаружена эффективная минерализация регенерата при сравнительно невысоком содержании в нем мукополисахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Илизаров Г. А. — В кн.: Съезд травматологов-ортопедов СССР. 1-й Труды. М., 1965, с. 166—168. — 2. Илизаров Г. А., Хелимский А. М., Девятков А. А. и др. — Экспер. хир., 1975, № 2, с. 37—42. — 3. Гайдамак А. Н., Леонтьев В. К. — В кн.: Теория и практика стоматологии. М., 1956, с. 145—148. — 4. Каракашов А. В., Вичев Е. Микрометоды в клинической лаборатории. София, 1968, с. 146—147. — 5. Newman R. E., Logan M. A. — J. biol. Chem., 1950, v. 184, p. 299—304. — Цит. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л., 1969. — 6. Dische Z. — J. biol. Chem., 1955, v. 167, p. 189—199. — 7. Waggen L. J. — Ibid., 1959, v. 234, p. 1971—1975. — 8. Elson L. A., Morgan W. T. — Biochem. J., 1933, v. 27, p. 1824. — 9. Балаба Т. Я. — В кн.: Биохимические исследования в травматологии и ортопедии. М., 1972, с. 5—11. — 10. Касавина Б. С., Рихтер А. И., Зенкевич Д. Г. и др. — В кн.: Международный биохимический конгресс. 5-й. Рефераты секционных сообщений. М., 1961, т. 2, с. 172—173. — 11. Перфилова Т. Н. Влияние галаскорбина на некоторые стороны белкового и минерального обмена при заживлении повреждений трубчатых костей. Автореф. дис. канд. Киев, 1966. — 12. Зенкевич Г. Д., Касавина Б. С. — Биохимия, 1962, т. 27, № 2, с. 279—285. — 13. Слуцкий Л. И. — В кн.: Съезд травматологов-ортопедов республик Прибалтики. 1-й. Материалы. Рига, 1964, с. 272—275. — 14. Кгот-

research S. — В кн.: Механизмы регенерации костной ткани. М., 1972, с. 146—165. 15. Стецук В. И. — В кн.: Центральный ин-т травматологии и ортопедии. Сессия с институтами травматологии, ортопедии и протезирования Украины. Материалы. Харьков, 1967, с. 141—144. 16. Brighton C. T., Friedenberg Z. B. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1974, v. 238, p. 314—320. — 17. Илизаров Г. А., Хелимский А. М., Берко В. Г. — В кн.: Теоретические и практические аспекты чрескостного компрессионного и дистракционного остеосинтеза. Курган, 1976, с. 65—67. — 18. Лаврищева Г. М., Птич В. П. — В кн.: Всесоюзный съезд травматологов-ортопедов. 3-й. Труды. М., 1976, с. 170—174. — 19. Urist M. R. — J. Bone Jt. Surg., 1964, v. 46-A, p. 889—900.

Поступила 4/VII 1978 г.

MUCOPOLYSACCHARIDES, COLLAGEN AND CALCIUM OF BONE REGENERATE IN SUBSTITUTION OF BONE IMPAIRMENT USING A METHOD OF MONOLOCAL COMPRESSION-DISTRIBUTIONAL OSTEOSYNTHESIS

V. N. Matveenko, V. K. Kamenin, A. N. Gaydamak, Yu. P. Baldin

Experimental Department, Institute of Experimental and Clinical Orthopedy and Traumatology, Kurgan

Intensive synthesis of collagen, which constitutes the basis of organic matrix in bone tissue, was observed in the regenerate developed during compression-distractational osteosynthesis. The organic matrix of the regenerate was quickly mineralized; after termination of the distraction it contained more than a half of calcium as compared with the mature bone of healthy animals. Relatively low accumulation of mucopolysaccharides in the regenerate appears to depend on development of favourable conditions of its blood supply together with suitable fixation of bone fragments.

УДК 616.832-002-056.43-092.9-07:616.74-008.931-074

В. М. Плесков, И. Л. Саакян

АКТИВНОСТЬ И ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ ГЕКСОКИНАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ РАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ РАЗЛИЧНО ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ МЫШЦ КРОЛИКА В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ

Отдел биохимии липидов и атеросклероза им. Н. Н. Апицкова Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Методами хроматографии на колонке и электрофореза в полиакриламидном геле в растворимой фракции клеток гладкой мышцы желудка кролика обнаружен только один изофермент гексокиназы типа I. По характеру обмена гладкая мышца желудка кролика занимает промежуточное положение между быстро сокращающейся и медленно сокращающейся скелетными мышцами, находясь ближе по уровню активности и изоферментному составу гексокиназы и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) к камбаловидной скелетной мышце. В различно функционирующих мышцах кроликов с ЭАЭ активность указанных ферментов изменялась не однозначно: в икроножной повышалась, в камбаловидной и гладкой снижалась. В растворимой фракции клеток икроножной мышцы кролика с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом происходил сдвиг изоферментного спектра ЛДГ в сторону увеличения аэробных H-форм фермента и снижения аэробных M-форм. В камбаловидной мышце почти в 2 раза повышалась концентрация ЛДГ-5 и ЛДГ-4 и уменьшалось содержание ЛДГ-1 и ЛДГ-2.

Согласно существующим представлениям, клетки тканей, лишённые нервной импульсации, утрачивают свою сложную структурно-химическую организацию и в известной степени «возвращаются» к более ранним этапам эволюционного развития [1]. Эти эволюционные идеи Л. А. Орбели нашли свое подтверждение и развитие в многочисленных исследованиях В. С. Ильина и сотрудников (1966—1976), направленных на выяснение биохимических основ нервной трофики скелетных мышц.

В то же время трофическая функция нервной системы в гладкой мускулатуре, стоящей по своим свойствам ближе к эмбриональной мышце, чем скелетная, изучена недостаточно. Исходя из этого настоящая работа была предпринята с целью получения экспериментальных доказательств

роли нервной системы в регуляции активности и изоэнзимного состава гексокиназы (ГК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в гладких мышцах желудка кролика в норме и при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ) и сопоставления этих данных с таковыми скелетных мышц: быстро сокращающейся — икроножной и медленно сокращающейся — камбаловидной.

Методы исследования

В опытах использовали гладкие мышцы стенки желудка, а также различно функционирующие скелетные мышцы кроликов-самцов массой 2,5—3 кг. Животных содержали на обычной лабораторной диете и использовали в опытах в осенне-зимний период. После декапитации животных извлекали желудок, освобождали его от содержимого, промывали холодной дистиллированной водой, удаляли слизистую оболочку, ткань пилорической и фундальной частей отдельно измельчали ножницами и растирали в ступке с 0,15 М КСl и 0,01 М глюкозой в разведении 1 : 6. Параллельно извлекали скелетные мышцы (икроножную и камбаловидную) и готовили гомогенат, как указано выше. Полученные гомогенаты центрифугировали 45 мин при $12\,000 \times g$; надосадок фильтровали через бумажный фильтр и использовали непосредственно в опытах. Для предотвращения инактивации исследуемых ферментов все процедуры по выделению растворимой фракции выполняли при 4°C . Активность ГК и ЛДГ измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-16 [2, 3]. За единицу активности фермента принимали количество микромолей НАДФ·Н, образующегося при комнатной температуре за 1 ч (для ГК), и НАД·Н, образующегося за 1 мин (для ЛДГ), и рассчитывали на 1 мг белка и 1 г сырой массы ткани. Количество белка в пробах измеряли микробиуретовым методом [4]. Изоферментный состав ГК и ЛДГ устанавливали с помощью вертикального диск-электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) [5], а также на ДЭАЭ-целлюлозе [6] с целью идентификации выделенных изоферментов. Сканирование электрофореграмм проводили на автоматическом densитометре Integrator CN фирмы «Leitz». Автоматическую запись выхода белков с ДЭАЭ-целлюлозы осуществляли с помощью «Увикорда» (ЛКБ), настроенного на длину волны 255 нм. ЭАЭ воспроизводили у кроликов, инокулируя им подкожно 5 мг выделенного нами основного энцефалитогенного белка в смеси с 0,8 мл полного адьюванта Фрейнда.

Результаты и обсуждение

У кроликов с ЭАЭ, вызванным введением им очищенного полипептида миелина спинного мозга, нарушалась трофика тканей (резкая атония желудка и изъязвление его слизистой оболочки с проникновением язв в мышечный слой), наблюдались выраженные парезы и параличи задних конечностей и т. д., что обусловливается развитием демиелинизирующего процесса в головном и спинном мозге животных. Исходя из этого в настоящей работе исследовали активность и изоферментные профили ГК и ЛДГ в указанных выше тканях кролика с нарушенной в результате развившегося в ЦНС животных демиелинизирующего процесса нервной импульсацией. Полученные данные сопоставляли с активностью и изоэнзимным составом ферментов аналогичных тканей интактных кроликов.

Как видно из табл. 1, активность ГК гладких мышц интактного кролика достаточно высока и близка к активности фермента в медленно сокращающейся камбаловидной мышце. В то же время у кроликов с ЭАЭ наблюдалось снижение активности ГК почти в 2 раза в мышце пилорического отдела желудка и статистически достоверное снижение активности фермента в мышце фундального отдела. В быстро сокращающейся икроножной мышце у животных с проявлением ЭАЭ активность ГК достоверно повышалась и отмечалась тенденция к нивелированию различий активности фермента в быстро и медленно сокращающихся мышцах.

Известно, что изоферменты ГК обладают различной устойчивостью к тепловому воздействию. Это свойство можно использовать при изучении изоэнзимного состава данного фермента [7]. В настоящей работе было установлено, что при прогревании растворимой фракции камбаловидной и икроножной скелетных мышц при 55°C в течение 15 мин активность ГК в них падала соответственно на 79 и 55%, тогда как активность этого фермента в гладкой мышце практически не изменялась. Этот факт свидетельствует о том, что ГК в растворимой фракции

гладкой мышцы желудка кролика представлена в основном первым, наиболее стабильным к действию температуры изоферментом.

Изучение изоферментного состава ГК растворимой фракции гладких мышц желудка кролика показало, что в этой ткани присутствует только 1 изоэнзим указанного фермента (рис. 1 на вклейке), в то время как в других тканях организма их 2 и более [8]. Данные об изоферментном составе ГК гладкой мышцы желудка кролика, полученные с помощью температурной инактивации и электрофореза в ПААГ, были проверены и уточнены методом хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Оказалось, что при элюции линейным градиентом KCl от 0 до 0,6 М вся активность ГК обнаруживалась только в одном пике (заштрихованный участок на рис. 2), элюирующемся с колонки при концентрации соли 0,14—0,16 М. Ранее проведен-

Т а б л и ц а 1

Активность ГК растворимой фракции мышц кролика в норме и с ЭАЭ

Тип мышцы	Норма		ЭАЭ	
	в расчете на 1 мг белка за 1 ч	в расчете на 1 г ткани за 1 ч	в расчете на 1 г ткани за 1 ч	в расчете на 1 г ткани за 1 ч
Медленно сокращающаяся (15) Р	0,430±0,017	34,1±4,49	0,378±0,723 <0,05	17,7±1,67 <0,001
Быстро сокращающаяся (15) Р	0,121±0,007	11,0±1,15	0,195±0,018 <0,001	18,5±2,41 <0,001
Гладкая мышца пилорической части (15) Р	0,434±0,039	34,1±3,20	0,252±0,015 <0,001	26,5±4,79 <0,02
Гладкая мышца фундальной части (15) Р	0,426±0,034	32,3±4,38	0,305±0,017 <0,01	18,3±2,38 <0,02

Пр и м е ч а н и е. В скобках указано число опытов.

ными исследованиями было установлено, что 1 тип ГК растворимой фракции скелетных мышц кролика элюируется при такой же молярности KCl [9]. С целью подтверждения того, что выделенный из гладких мышц желудка изофермент является действительно 1 типом ГК, была определена K_m по убыви концентрации АТФ (рис. 3). Полученная величина K_m , равная 4,

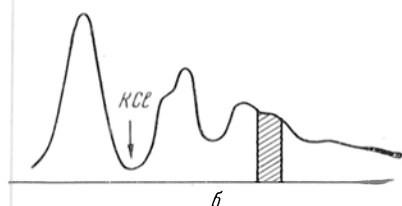


Рис. 2. Разделение изоферментов ГК методом хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

Размер колонки 2,8×40 см. Скорость движения ленты самописца «Увикорд» 2 см/ч. Скорость элюции 60 мл/ч. Заштрихованный участок протеинограммы соответствует ферментативной активности 1 типа ГК.

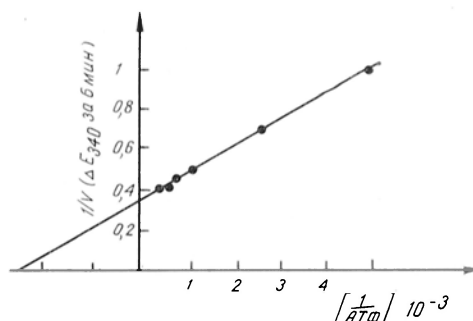


Рис. 3. Определение константы Михаэлиса по убыви концентрации АТФ для 1 типа гладкой мышцы желудка кролика по Лайнуиверу — Бэрку.

0·10⁻⁴ М, доказывает, что в очищенной фракции содержится только 1 тип ГК, наиболее стабильный к физико-химическим и гормональным воздействиям. По-видимому, меньшая чувствительность гладких мышц млекопитающих к действию инсулина, установленная Ариквистом для гладких мышц сосудов и кишечника [10], может быть объяснена именно с этой точ-

ки зрения, так как известно, что чувствительность ГК тканей к действию инсулина обуславливается содержанием в них гормоночувствительного II типа энзима [8]. Таким образом, на основании данных об изоферментном составе ГК гладких мышц желудка кроликов с ЭАЭ можно сделать вывод о том, что активность фермента в них снижается за счет единственно обнаруженного нами типа I.

ЛДГ играет важную роль в регуляции обмена пирувата. Изменение суммарной активности фермента, а также перестройка его изоферментного профиля во многом определяют соотношение между анаэробным гликолизом и циклом Кребса. В связи с этим представляется интересным исследование активности и изоэнзимного состава ЛДГ в различно функционирующих скелетных мышцах желудка кроликов в норме и при ЭАЭ. Результаты исследований активности ЛДГ в указанных тканях представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Активность ЛДГ в растворимой фракции различно функционирующих мышц кроликов в норме и с проявлениями ЭАЭ

Тип мышцы	Норма		ЭАЭ	
	в расчете на 1 мг белка за 1 мин	в расчете на 1 г ткани за 1 мин	в расчете на 1 мг белка за 1 мин	в расчете на 1 г ткани за 1 мин
Медленно сокращающаяся (15) Р	0,926±0,065	50,9±7,82	0,760±0,062 <0,005	34,9±5,11 <0,01
Быстро сокращающаяся (15)	5,17±0,255	47,2±22,13	6,17±0,365	55,12±2,95
Гладкая мышца пилорической части Р	0,299±0,032	27,2±0,83	0,228±0,021 <0,05	21,4±1,60 <0,01
Гладкая мышца фундальной части Р	0,241±0,009	12,7±0,49	0,127±0,014 <0,001	9,24±0,95 <0,01

Примечание. В скобках указано число опытов.

Как следует из табл. 2, в быстро сокращающейся икроножной мышце активность ЛДГ намного превышала таковую в медленно сокращающейся камбаловидной мышце, что полностью соответствует данным литературы [11]. В растворимой фракции гладких мышц пилорического и фундального отделов желудка кроликов активность ЛДГ была значительно ниже по сравнению с таковой скелетных мышц (в 3 раза ниже по сравнению с активностью медленно сокращающейся мышцы и в 17 раз ниже по сравнению с активностью быстро сокращающейся мышцы).

Т а б л и ц а 3

Изоферментный состав ЛДГ (в %) в различно функционирующих мышцах кролика в норме и при ЭАЭ

Тип мышцы	Состояние животного	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5
Медленно сокращающаяся	Норма	43,8	35,9	18,0	2,0	1,2
	ЭАЭ	36,4	32,6	25,2	3,8	1,6
Быстро сокращающаяся	Норма	12,0	12,0	14,8	10,9	51,3
	ЭАЭ	17,8	14,8	15,3	10,5	42,3
Гладкая мышца пилорической части	Норма	46,9	36,5	14,6	2,0	0,3
	ЭАЭ	42,6	34,0	12,3	6,9	3,9
Гладкая мышца фундальной части	Норма	35,6	40,0	22,3	1,7	0,5
	ЭАЭ	32,2	34,4	26,6	5,5	1,0

Результаты определения активности ЛДГ в растворимой фракции клеток скелетных мышц кроликов с ЭАЭ показали, что в фазовых и тонических мышцах происходят разнонаправленные изменения активности фермента. В камбаловидной тонической мышце активность ЛДГ при ЭАЭ снижалась,

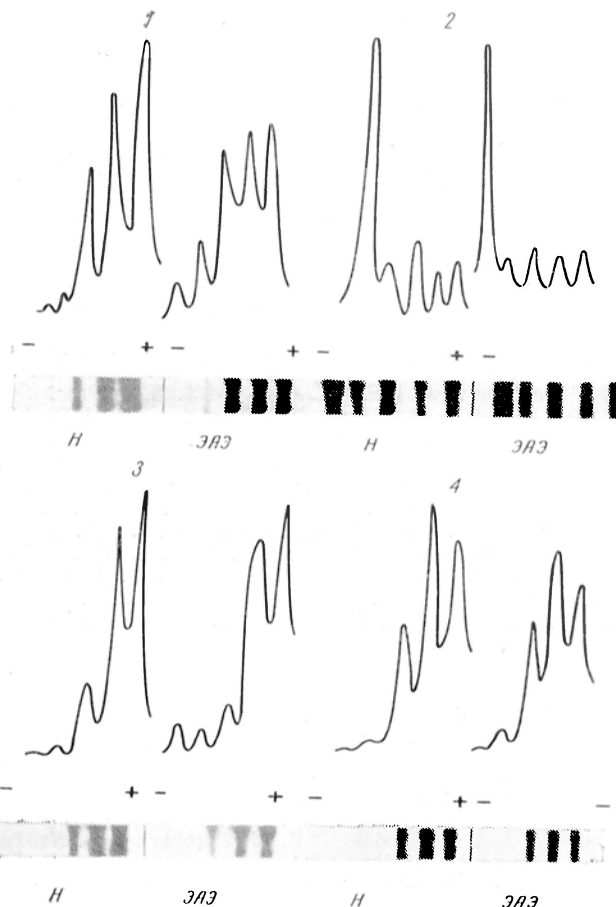
в икроножной фазовой — повышалась. В гладких мышцах желудка кроликов с ЭАЭ активность ЛДГ снижалась по сравнению с активностью в мышцах интактного кролика, причем в фундальной части желудка снижение активности фермента было выражено более отчетливо, чем в пилорической.

Как известно, изоферменты ЛДГ в клетках тканей выполняют различную функцию [12]. ЛДГ-1, обладающая наибольшей электрофоретической подвижностью, в основном катализирует реакцию окисления лактата до пирувата, характерную для аэробного типа гликолиза. Медленно мигрирующий изофермент ЛДГ-5 преимущественно катализирует реакцию восстановления пирувата до лактата и участвует в анаэробном гликолизе [12]. Таким образом, соотношение между различными изоферментами ЛДГ, определяющими степень окисления цитоплазматического НАД·Н, играет важную роль в установлении определенного взаимоотношения между гликолизом и дыханием в тканях организма. В табл. 3 и на рис. 4 приведены результаты исследования изоферментного состава ЛДГ в растворимой фракции скелетной и гладкой мышц кроликов в норме и при ЭАЭ.

Из табл. 3 видно, что гладкая мышца желудка кролика по изоферментному составу ЛДГ имеет существенное сходство с тонической скелетной мышцей, т. е. в гладкой мышце так же, как и в икроножной, преобладали Н-изоэнзимы фермента, в то время как изоферменты М-типа составляли только 2,2% от общей активности.

Рис. 4. Электрофоретическое разделение изоферментов ЛДГ растворимой фракции клеток.

1 — икроножная мышца; 2 — камбаловидная мышца; 3 — гладкая мышца желудка (пилорическая часть); 4 — гладкая мышца желудка (фундальная часть). Н — мышца интактного кролика; ЭАЭ — мышца кролика с ЭАЭ.



В растворимой фракции быстро сокращающейся мышцы кроликов при ЭАЭ происходил сдвиг изоферментного спектра ЛДГ в сторону увеличения аэробных Н-типов фермента и снижения анаэробных М-типов. В то же время в медленно сокращающейся мышце почти в 2 раза увеличивалось содержание ЛДГ-5 и ЛДГ-4 и уменьшалось содержание ЛДГ-1 и ЛДГ-2. В гладких мышцах желудка кроликов с ЭАЭ наблюдались изменения изоферментного спектра ЛДГ, аналогичные таковым для тонической мышцы, т. е. в сторону увеличения анаэробных и снижения аэробных форм.

Полученные данные свидетельствуют о том, что гладкая мышца желудка кролика (пилорического и фундального отделов) относится к типу «А»

согласно гипотезе Лабори [13] с характерной высокой активностью пути Эмбдена — Мейергофа и прямого окисления глюкозы. Метаболическая система этой ткани характеризуется преобладанием пентозного пути, при этом цикл Кребса мало активен. Синтез АТФ в этом случае осуществляется в основном путем Эмбдена — Мейергофа. Образующийся в результате гексокиназной реакции в больших количествах глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) обеспечивает оптимальное функционирование этих путей.

В настоящее время трудно дать исчерпывающее объяснение значения высокого уровня активности ГК в тканях с преобладанием аэробного обмена (икроножная мышца). Весьма вероятно, что образующийся в гексокиназной реакции Г-6-Ф так же, как и в гладкой мышце, используется клеткой в реакциях пентозо-фосфатного пути. Другими словами, камбаловидная мышца в большей степени испытывает потребность в Г-6-Ф. Можно также предположить, что в тонической мышце высокий уровень гликолиза до пирувата необходим для дальнейшего использования пирувата в реакциях тканевого дыхания, интенсивно протекающих в тонической мышце. Возможно, ГК в этом случае играет существенную роль при акцентировании глюкозой фосфата от образующегося в митохондриях АТФ.

Следует подчеркнуть, что в скелетных мышцах (фазовых и тонических) кроликов с ЭАЭ активность ГК и ЛДГ изменялась не однозначно: в икроножной возрастала, в камбаловидной снижалась. По-видимому, различные по своей функциональной характеристике мышцы (быстро сокращающаяся и медленно сокращающаяся) не одинаково реагировали на одно и то же воздействие — утрату или ограничение поступления в ткань нервных импульсов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орбели Л. А. Избранные труды. М. — Л., 1961, т. 1, с. 214; 298.
2. Salas M., Vinuela E., Sols A. — J. biol. Chem., 1963, v. 238, p. 3535.
3. Wroblewski F., La Due J. S. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1955, v. 90, p. 210.
4. Itzhaki R. F., Gill D. M. — Analyt. Biochem., 1964, v. 9, p. 401.
5. Harrison R. A. P. — Ibid., 1974, v. 61, p. 500.
6. Ильин В. С., Плесков В. М., Разумовская Н. И. — Биохимия, 1970, № 2, с. 312.
7. Плесков В. М. — Вопр. мед. химии, 1976, № 2, с. 233.
8. Katzen H. M. — Advanc. Enzyme Regulat., 1967, v. 5, p. 335.
9. Grossbard L., Schimke R. T. — J. biol. Chem., 1966, v. 241, p. 3546.
10. Arngvist N. J. — Acta Pharmacol. Toxicol., 1973, v. 33, p. 459.
11. Bostrom S.-L., Hogberg G., Johansson K. G. — Int. J. Biochem., 1973, v. 4, p. 415—420.
12. Dowson D. M., Goodfriend T. L., Kaplan N. O. — Science, 1964, v. 143, p. 929.
13. Лабори А. (Laborit H.) Регуляция обменных процессов. М., 1970.

Поступила 6/VII 1978 г.

ACTIVITY AND ISOZYME SPECTRA OF HEXOKINASE AND LACTATE DEHYDROGENASE FROM SOLUBLE FRACTION OF DISSIMILARLY FUNCTIONING MUSCLES OF RABBIT IN NORMAL STATE AND IN EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

V. M. Pleskov, I. L. Saakyan

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

Only one isozyme of hexokinase (type I) was found in a soluble fraction of smooth muscle of rabbit stomach using column chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. By the pattern of metabolism the smooth muscle of rabbit stomach occupies an intermediate position between rapidly and slowly contracting skeletal muscles, approaching to musculus soleus by the activity and isozyme spectra of hexokinase and lactate dehydrogenase (LDH). Activity of these enzymes was altered not uniformly in dissimilarly functioning muscles of rabbits with experimental allergic encephalomyelitis: it was increased in musculus gastrocnemius of rabbits and decreased in soleus or in smooth muscles. LDH isoenzyme spectra changed towards an increase in aerobic H-subunits and decrease in anaerobic M-subunits in the soluble fraction of musculus gastrocnemius of rabbits with experimental allergic encephalomyelitis. Content of LDH-5 and LDH-4 was about 2-fold increased and content of LDH-1 and LDH-2 was decreased in musculus soleus.

А. С. Сорокин, Г. С. Якобсон

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ КРЫС ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕРОДОМ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Новосибирского медицинского института

Показано, что через 8 и 24 ч после однократного отравления крыс CCl_4 активность ферментов глюконеогенеза снижается в большей степени, чем активность ферментов гликолиза. Через 72 ч активность ферментов гликолиза и глюконеогенеза не отличается от контроля, а активность ферментов гексозомонофосфатного шунта в 2—3 раза выше соответствующего показателя у интактных животных.

Острая интоксикация животных гепатотропными ядами, такими, как CCl_4 , тиацетатамид, галактозамин, бромбензол, парацетамол, приводит к значительным нарушениям структуры и функции органа, в том числе к изменениям активности ферментов углеводного обмена [1—4]. Подобные изменения активности ферментов, хотя и несколько менее выраженные, наблюдаются и при вирусном гепатите, а также после удаления части печени [1]. Вероятно, эти изменения не являются специфическими для CCl_4 , а характер перестройки при этом по ряду показателей приближает функциональное состояние органа взрослого организма к фетальной печени [1], менее дифференцированной по определенным функциям. Оценка активности ферментов позволяет судить о степени дифференцировки гепатоцитов в динамике восстановления, а также о направлении метаболизма углеводов.

В данной работе изучалась активность некоторых ферментов гликолиза, глюконеогенеза и гексозомонофосфатного шунта (ГМФС) в печени после однократной интоксикации крыс CCl_4 . Исследование проводили с целью анализа степени повреждения трех перечисленных выше путей метаболизма углеводов. Один из них, глюконеогенез из аминокислот, является уникальной функцией печени. Работы подобного рода малочисленны [1, 5, 6] и в них не изучалась динамика этих показателей после однократного введения CCl_4 .

Методика

Опыты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 160—180 г. Интоксикацию вызывали внутрижелудочным введением 50% масляного раствора CCl_4 — 0,25 мл на 100 г массы тела. Животных забивали декапитацией. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [7], гексокиназы (ГК) [8], аланин-аминотрансферазы (АлАТ) [9], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГДГ) [10], тирозинаминотрансферазы (ТАТ) [11] определяли в растворимой фракции печени после центрифугирования гомогената при 105 000 g в течение 1 ч; активность глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Ф-азы) определяли в гомогенате печени [12]. Активность ГК, Г-6-ФДГ, ТАТ, АлАТ выражали в микромолях, ЛДГ — в миллимолях субстрата в 1 мин на 1 г белка, а Г-6-Ф-азы в микромолях в 1 мин на 1 г сырой массы ткани. Активность Г-6-Ф-азы и ТАТ измерена при 37°C, остальных ферментов — при 25°C. Белок определяли по методу Лоури [13].

Результаты и обсуждение

В таблице представлены изменения активности некоторых ферментов глюконеогенеза, гликолиза и окислительной ветви ГМФС после однократного отравления животных CCl_4 . Острая интоксикация крыс вызвала 3-кратное повышение активности ТАТ в печени через 8 ч после введения яда. Активность других ферментов или достоверно не изменялась (ЛДГ, ГК, АлАТ, Г-6-ФДГ, 6-ФГДГ), или снижалась в 2,3 раза (Г-6-Ф-аза). Через 24 ч после отравления, когда, как известно, наблюдается субмаксимальный эффект деструкции печени, активность ЛДГ, ГК и Г-6-Ф-азы снижалась

Активность ферментов глюконеогенеза, гликолиза и гексозомонофосфатного шунта печени крыс через 8, 24 и 72 ч после отравления CCl_4

Животные	ТАТ	АЛАТ	Г-6-Ф-аза	ЛДГ	ГК	Г-6-ФДГ	6-ФГДГ
Интактные							
Отравленные CCl_4 :							
через 8 ч	23±4 (14)	101±18 (11)	7,9±0,71 (15)	2,9±0,24 (16)	11,3±1,26 (13)	48±11 (12)	71±8 (13)
» 24 ч	67±21 (5)	147±63 (4)	3,4±0,30 (5)	3,2±0,56 (5)	9,9±1,92 (4)	25±4 (3)	45±6 (3)
» 72 ч	45±17 (5)	80±18 (4)	3,1±0,58 (4)	2,1±0,39 (5)	7,4±1,84 (4)	71±15 (5)	80±21 (5)
	34±7 (4)	84±13 (2)	6,8±0,98 (5)	4,1±0,69 (4)	9,3±1,87 (5)	101±23 (4)	82±7 (4)
	$P_{1-2}<0,01$	—	$P_{1-2}<0,01$	$P_{3-4}<0,05$	—	$P_{1-4}<0,05$	$P_{2-4}<0,02$

Примечание. В скобках — число животных; единицы измерения активности ферментов указаны в методике исследования.

до минимальных величин, но была заметна тенденция к повышению активности Г-6-ФДГ и 6-ФГДГ. Через 72 ч, когда деструктивные процессы уже в значительной мере ослабевают и наблюдаются явления структурно-функционального восстановления печени, мы отмечали достоверное повышение активности ЛДГ в 2 раза, ферментов ГМФШ в 2—3 раза, Г-6-Ф-азы в 2,2 раза относительно минимального уровня, наблюдаемого через 8 ч или 24 ч. Активность остальных ферментов (ГК, АЛАТ, ТАТ) через 72 ч не изменялась.

Из приведенных данных видно, что в момент повреждения (24 ч) только активность ферментов ГМФШ имеет тенденцию к повышению. Это согласуется с известными данными о том, что через 24 ч после отравления CCl_4 синтез Г-6-ФДГ увеличен в 2,9 раза [14].

Как известно, одним из моментов действия CCl_4 является повреждение белок-синтезирующего аппарата гепатоцитов. Сообщалось, что введение глюкокортикоидов не активирует ТАТ через 8 и 24 ч после отравления CCl_4 [15]. Реакция на гормон регистрируется лишь через 72 ч после отравления. Отсутствие индукции, вероятно, связано с подавлением синтеза белка в клетках печени в ранние сроки после интоксикации.

Изменения активности ферментов, обнаруженные нами, по-видимому, не являются специфическими для CCl_4 , так как подобные результаты получены и с другими гепатотоксинами, такими, как тиоцетамид и галактозамин [16]. Можно полагать, что представленные данные скорее всего отражают изменения в клеточной популяции в результате некроза и регенерации гепатоцитов. Действительно, имеются данные о различном распределении некоторых ферментов в печеночной ткани [17—19].

Повреждение касается прежде всего глюконеогенетической функции гепатоцитов, что подтверждается данными о снижении более чем в 2 раза активности Г-6-Ф-азы. Известно, что, кроме Г-6-Ф-азы, после отравления гепатотоксинами снижается активность ключевых ферментов глюконеогенеза: фруктозо-1,6-дифосфатазы, фосфоэнолпируваткарбоксикиназы и пируваткарбоксилазы [1, 20]. При этом активность ключевых ферментов гликолиза снижается в меньшей степени, а активность ферментов ГМФШ

даже увеличивается, причем максимум достигается примерно к 72 ч после отравления [14].

Следовательно, при действии CCl_4 повреждаются прежде всего дифференцированные по глюконеогенетической функции клетки печени в центре дольки, и изменяющийся состав клеточной популяции приводит к некоторой дедифференцировке органа, проявляющейся в снижении глюконеогенеза, а также в отсутствии действия глюкокортикоидов на индукцию ТАТ [15]. Таким образом, изменение активности ферментов, вовлекаемых в метаболизм глюкозо-6-фосфата после отравления CCl_4 , свидетельствует о том, что ферменты глюконеогенеза, вероятно, расположены в клетках центральной части дольки печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Taketa K., Tanaka A., Watanabe A. et al. — *Enzyme*, 1976* v. 21, p. 158. — 2. Murphy S. D., Malley S. — *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 1969, v. 15, p. 117. — 3. Ueda M., Taketa K., Kosaka K. — *Clin. chim. Acta*, 1975, v. 60, p. 77. — 4. Ideo G., Del Ninno E., de Franchis R. — *Enzyme*, 1971, v. 12, p. 242. — 5. Serban M., Serban M. — *Rev. roum. Biochim.*, 1973, v. 10, p. 69. — 6. Гордеева Г. Ф. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 4, с. 422. — 7. Немчинская В. Л., Ганелина Л. III., Браун А. Д. — *Цитология*, 1968, № 3, с. 323. — 8. Di Pietro D. L., Weinhouse S. — *J. biol. Chem.*, 1960, v. 235, p. 2542. — 9. Methoden der enzymatischen Analyse. Hrsg. H. U. Bergmeyer. Berlin, 1970, Bd 1, S. 422. — 10. Rudack D., Chisholm E. M., Holten D. — *J. biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 1249. — 11. Diamondstone T. I. — *Analyt. Biochem.*, 1966, v. 16, p. 395. — 12. Wills E. D. — *Biochem. J.*, 1971, v. 123, p. 983. — 13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265. — 14. Watanabe A., Taketa K. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1973, v. 73, p. 771. — 15. Яковсон Г. С., Сорокин А. С., Гизатулин З. Я. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 5, с. 701. — 16. Monier D., Wagler S. R. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1971, v. 136, p. 377. — 17. Sapag-Hagar M., Marso R., Sols A. — *FEBS Letters*, 1969, v. 3, p. 68. — 18. Van Berkel T. J. C., Koster J. F., Hülsmann W. C. — *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 276, p. 425. — 19. Morrison G. R., Brock F. E., Karl I. E. et al. — *Arch. Biochem.*, 1965, v. 111, p. 448. — 20. Taketa K. — *Acta med. Okayama*, 1973, v. 27, p. 205.

Поступила 8/VII 1978 г.

ALTERATION IN ACTIVITY OF ENZYMES OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN RAT LIVER TISSUE AFTER AN INTOXICATION WITH CCl_4

A. S. Sorokin, G. S. Yakobson

Central Research Laboratory, Medical School, Novosibirsk

Activity of gluconeogenic enzymes was more distinctly decreased than the activity of glycolytic enzymes within 8 and 24 hrs after a single intoxication of rats with CCl_4 . Within 72 hrs the enzymatic activity of glycolysis and gluconeogenesis was similar but the activity of the enzymes participating in the hexose monophosphate shunt was 2-3-fold higher as compared with the patterns characteristic for the intact animals. Mechanisms of these alterations are discussed; they are apparently related to the change in hepatocyte population due to necrosis and regeneration as well as to localization of enzymes of gluconeogenesis in central part of liver lobule.

В. Б. Складнева, Л. А. Чекановская, Т. И. Тихоненко

ОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ АМИНОКИСЛОТ, УЧАСТВУЮЩИХ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ДНК В СОСТАВЕ ВИРУСНОГО НУКЛЕОПРОТЕИДА

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

Описан метод идентификации аминокислот в составе ковалентных ДНК-белковых сшивок, образующихся при модификации цельного фага C_{ϕ} бисульфитом натрия. Метод основан на увеличении количества свободных аминокислот после обработки выделенных продуктов сшивки эквимольной смесью *O*-метилгидроксиламина и бисульфита Na . Для сравнительного полук количественного анализа аминокислот применена тонкослойная хроматография на пластинках Фиксион 50×8 .

В исследованиях структуры вирусного нуклеопротеида важное место занимает изучение характера нуклеотид-белкового взаимодействия, в частности идентификация аминокислот, участвующих во взаимодействии с ДНК (РНК).

Применяемый для этой цели нуклеофильный агент бисульфит [1—5] позволяет фиксировать в виде ковалентной нуклеотид-белковой сшивки (рис. 1) существующие в нуклеопротеиде нековалентные полярные взаимо-

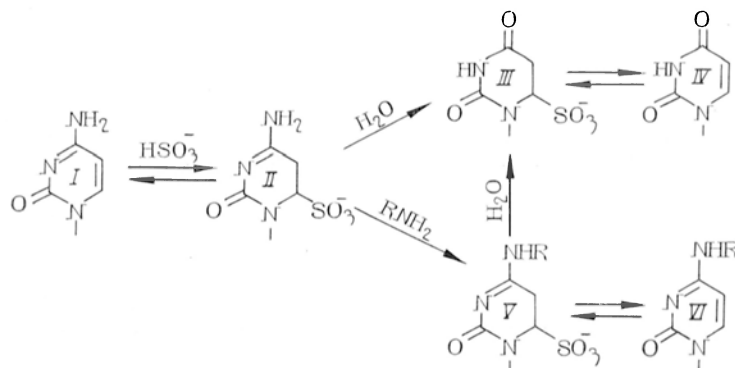


Рис. 1. Схема образования ковалентных нуклеотид-белковых связей с помощью бисульфита.

действия. Образующиеся после удаления бисульфита цитозиламинокислоты выдерживают условия жесткого кислого гидролиза [6], что дает принципиальную возможность анализа нуклеотидного [5] и аминокислотного компонентов вируса, участвующих в нуклеопротеидном взаимодействии вируса. Однако если анализ оснований, участвующих в таком взаимодействии, осуществляется относительно просто [5, 7], то идентификация аминокислот в составе индуцированных бисульфитом ковалентных ДНК-белковых сшивок встречает значительные методические трудности. Преодолению этих трудностей и посвящена настоящая работа, в основу которой положен тот факт, что максимальный гидролиз C_4-N связи с отщеплением аминокислот, так называемая расшивка продуктов типа VI, происходит лишь при обработке их эквимольной смесью *O*-метилгидроксиламина (ОМГА) и бисульфита Na (рис. 2) [3].

Описанный ниже метод основан на полук количественном сравнительном анализе основных и ароматических аминокислот модифицированного бисульфитом вируса до и после расшивки смесью ОМГА и бисульфита [3, 5].

Методы исследования

Анализ проводили с помощью метода ионообменной хроматографии в тонком слое на пластинках Фиксион 50×8.

Модификацию бисульфитом Na бактериофага С_д проводили в условиях, описанных ранее [5, 7]. Для выделения цитозил-аминокислот использовали содержащий цитозил-пептиды материал, полученный гель-фильтрацией хлорнокислого гидролизата модифицированного фага на биогеле Р-4 [5, 7].

Материал, содержащий цитозил-пептиды в количестве 0,5—4,0 ед. опт. пл. при 270 нм, подвергали гидролизу в условиях полного разрыва пептидных связей (6 н.

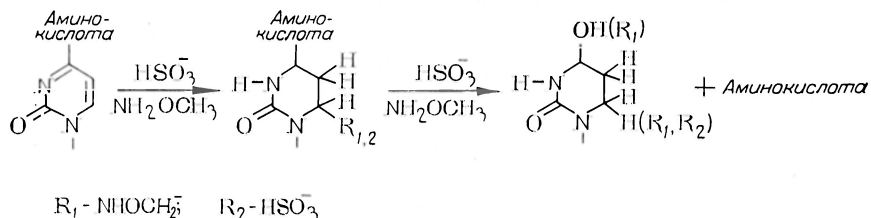


Рис. 2. Схема расщепления цитозинаминокислотных сшивок смесью О-метилгидроксиламина и бисульфита.

HCl, 24 ч, 110—120°C, в атмосфере азота). После гидролиза н максимального удаления HCl гидролизат растворяли в воде. Из полученного раствора отбирали 2 аликвоты, каждую упаривали досуха на роторном испарителе. К одной из них приливали 10—50 мкл воды (из расчета примерно 10 мкл на 0,5 ед. опт. пл. при 270 нм), тщательно растворяли и добавляли равный объем смеси 2М ОМГА—2М NaHSO₃ (рН инкубационной смеси 5,5).

Пробу для расшивки инкубировали при 37°C 5 ч, затем удаляли непрореагировавший ОМГА на роторном испарителе, а остатки ОМГА в виде оксима ацетона (также на роторном испарителе). Процедуру повторяли 3—4 раза. Полученный осадок растворяли в минимальном количестве воды и наносили на пла-

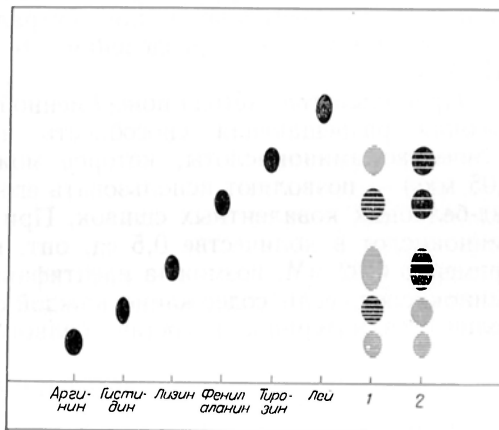


Рис. 3. Схема хроматографического разделения основных и ароматических аминокислот до и после расшивки на пластинках Фиксион 50×8. 1 — солянокислый гидролизат фага С_д, содержащий цитозил-аминокислоты; 2 — то же, но после обработки эквимольной смесью ОМГА — бисульфит Na.

стинку Фиксион 50×8 (рис. 3, 2). Для сравнения на пластинку наносили ту половину исследуемого образца, которую не подвергали обработке нуклеофильными агентами (см. рис. 3, 1) и набор аминокислот-маркеров. Пластинки уравнивали и проявляли в стандартных условиях для разделения основных и ароматических аминокислот (цитратный буфер, рН 5,23) [8].

Для обнаружения аминокислот пластинку опрыскивали раствором кадмиевого-нигидринового реагента. Количество аминокислот до и после расшивки определяли после элюции метанолом по поглощению при 509 нм [9].

Результаты

На рис. 3 представлена схема типичного хроматографического разделения, а в таблице — результаты измерения поглощения элюатов соответствующих аминокислот. На основании приведенных данных можно считать, что в результате расшивки увеличивается количество основных и ароматических аминокислот в анализируемой смеси. Повышение содержания аминокислот после расшивки, по-видимому, можно рассматривать

как доказательство того, что они входили в состав цитозил-аминокислот и перешли в свободное состояние после инкубации с нуклеофильными агентами.

Доминирующей аминокислотой при описанном методе анализа является лизин. Это подтверждает полученные нами ранее данные о цитозил-лизине как основном продукте, входящем в состав сшивок при модификации фага C_d бисульфитом [5].

Полуколичественное определение аминокислот до и после инкубации с нуклеофильными агентами материала, содержащего цитозил-аминокислоты

Аминокислота	Оптическая плотность при 509 мμ	
	до инкубации 1	после инкубации 2
Аргинин	0,100	0,130
Гистидин + цитозил-лизин	0,190	0,090
Лизин	0,107	0,370
Фенилаланин	0,116	0,300
Тирозин	0,067	0,148

Следует напомнить, что при модификации бисульфитом РНК-содержащего бактериофага MS-2 также был обнаружен цитозил-лизин [6]. Уменьшение количества гистидина после расшивки объясняется, по-видимому, тем, что подвижность цитозил-лизина, который присутствует в смеси до расшивки, совпадает с подвижностью гистидина.

Таким образом, полученные нами данные сви-

детельствуют о том, что лизин, фенилаланин, тирозин и в значительно меньшей степени аргинин входят в состав ДНК-белковых сшивок, полученных модификацией фага C_d бисульфитом. Аналогичным образом, можно проводить сравнение и для нейтральных и кислых аминокислот, используя систему для разделения 16 аминокислот (цитратный буфер, рН 3,3).

Преимущества метода ионообменной хроматографии в тонком слое — высокая разрешающая способность и чувствительность (минимальное количество аминокислоты, которое может быть обнаружено, составляет 0,05 мкг) — позволяют использовать его для анализа аминокислот нуклеотид-белковых ковалентных сшивок. При нанесении на пластинку цитозил-аминокислот в количестве 0,5 ед. опт. пл. при 270 мμ, что соответствует примерно 0,02 мМ, возможна идентификация всех участвующих в сшивках аминокислот, если содержание каждой составляет не менее 2% от общего количества материала в составе белковой фракции ДНП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hayatsu H. — Progr. Nucl. Acid. Res. Molec. Biol., 1976, v. 16, p. 75. —
2. Budowsky E. I. — Ibid., p. 125. — 3. Budowsky E. I., Simukova N. A., Turchinsky M. F. et al. — Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, p. 261. —
4. Hilnen R., Schafer R., Franklin R. M. — Europ. J. Biochem., 1974, v. 50, p. 1. — 5. Складнева В. Б., Чекановская Л. А., Николаева И. А. и др. — Биохимия, 1978, т. 43, с. 1563. — 6. Boni I. V., Budowsky E. I. — J. Biochem. (Tokyo), 1973, v. 73, p. 821. — 7. Складнева В. Б., Николаева И. А., Амосенко Ф. А. и др. — В кн.: Молекулярная биология вирусов. Под ред. В. М. Жданова. М., 1973, с. 86. — 8. Дэвенн Т. и др. (Dévényi T. et al.) Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976, p. 242. — 9. Mortreuil M., Khouvine Y. — Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 1954, v. 36, p. 425.

Поступила 13/VII 1978 г.

ON THE IDENTIFICATION OF AMINO ACIDS, INTERACTING WITH DNA IN VIRAL NUCLEOPROTEIN

V. B. Sklyadneva, L. A. Chekanovskaya, T. I. Tikhonenko, D. I. Ivanovsky

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

A method is described for identification of amino acids participating in covalent DNA-protein cross-links formed in the course of modification of native C_D phage by sodium bisulfite. The method is based on estimation of increased content of free amino acids, formed after treatment of the isolated cross-link products using equimolar mixture of O-methyl hydroxylamine and sodium bisulfite. Thin layer chromatography on the plates Fixion 50×8 was used for comparative semi-quantitative analysis of amino acids.

УДК 616.61-006-097.2-074

З. М. Пчелкина, Б. П. Матвеев, Е. И. Рыкунов, А. А. Терентьев,
Ю. С. Татарinov

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ α -ГЛОБУЛИНОВ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА

Кафедра биохимии и Проблемная лаборатория по иммунохимии злокачественных и эмбриональных тканей II Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова, Онкологический научный центр АМН СССР, Москва

Проведен сравнительный иммунохимический анализ четырех индивидуальных тканевых белков в здоровой и опухолевой ткани почки (гипернефроидный рак, опухоль Вильмса). Обнаружено появление антигена, отсутствующего в дифинитивной ткани гомологичного происхождения, а также снижение биосинтеза некоторых гомологичных антигенов малигнизированной ткани.

Как известно, антигенная перестройка опухолевых тканей характеризуется по крайней мере тремя чертами [1]. Во-первых, антигенной конвергенцией, характеризующейся утратой или заметным снижением продукции как органоспецифических, так и гетероорганных антигенов [2, 3]. Во-вторых, антигенной дивергенцией, типичным проявлением которой является увеличение биосинтеза гетероорганных антигенов в опухолевой ткани [4, 5]. В-третьих, антигенной реверсией, для которой характерно появление в опухолевой ткани эмбриоспецифических белков [6, 7]. В настоящее время изучение антигенного состава опухолей приобретает клиническое значение в связи с разработкой иммунохимических методов диагностики и мониторинга рака.

В настоящей работе представлены результаты иммунохимического анализа некоторых α -глобулинов опухолевой ткани почки при гипернефроидном раке и нефробластеме (опухоль Вильмса).

Методы исследований

Для иммунизации кроликов были приготовлены экстракты почек взрослого человека (аутопсия) и плодов, полученных при прерывании беременности по медицинским показаниям. Кроме того, для иммунизации использовали белковые препараты, полученные из abortивного материала методом хроматографии с помощью иммуноблизированного на сефарозе эстрона. Полученные антисыворотки истощали плазмой и сывороткой крови доноров и экстрактами различных тканей человека. В работу были отобраны четыре партии истощенных моноспецифических антисывороток, выявляющих в тканевых экстрактах следующие антигены: α_1 -глобулин узкой специфичности почки (АУП-1), α_2 -глобулин широкой специфичности (АГШ-2), α_3 -глобулин широкой специфичности (АГШ-3) и α_2 -глобулин узкой специфичности селезенки (АУС-2).

С каждой моноспецифической тест-системой изучено по 6 наборов экстрактов тканей плодов и взрослого человека: мозга, легких, желудка, тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы, селезенки, печени, почки, надпочечника, сердца,

щитовидной железы, вилочковой железы. Экстракты тканей готовили на трис-глициновом буфере с добавлением детергентов.

Иммунохимический анализ проводили методом иммунодиффузии по Оухтерлони в модификации Храмковой и Абелева [8]. Электрофоретическую подвижность определяли методом иммуноэлектрофореза по методу Грабара и Вильямса [9].

Результаты и обсуждение

Исследуемые тканевые антигены обладали электрофоретической подвижностью α -глобулинов, мигрируя от зоны α_1 - до α_2 -глобулинов. Как видно из таблицы, АУП-1 был выявлен во всех пробах индивидуальных

Иммунохимическое определение тканевых антигенов в нормальной и опухолевой ткани почки

Ткань	Число проб	Частота выявления антигенов ¹			
		АУП-1	АГШ-2	АГШ-3	АУС-2
Нормальная почка	10	10/10	10/10	10/10	10/0
Опухоль Вильмса	17	11/0	17/17	11/11	17/10
Гипернефроидный рак	46	30/7	46/41	30/29	46/24

¹ В числителе — число изученных проб, в знаменателе — число положительных анализов.

экстрактов нормальных почек. Содержание этого антигена в среднем находилось в пределах 1 : 2. Следовые количества АУП-1 были найдены только в отдельных пробах печени (в 3 из 8), в то время как в других исследованных тканях этот антиген не был обнаружен. По классификации О. Е. Вязова, указанный антиген может быть отнесен в группу тканевых антигенов узкой специфичности. При изучении экстрактов опухолей почек АУП-1 был выявлен в 7 из 30 проб гипернефроидного рака, а в индивидуальных пробах опухолей Вильмса этот антиген не был обнаружен. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что феномен антигенного упрощения прежде всего связан с потерей тканевых антигенов узкой специфичности.

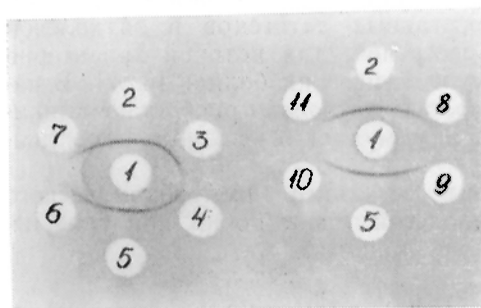


Рис. 1. Иммунохимический анализ АГШ-2 в экстрактах гипернефроидного рака в тканях человека.

1 — моноспецифическая антисыворотка к АГШ-2; 2, 5 — экстракт почки взрослого; 3, 4, 6, 7 — разведения экстракта гипернефроидного рака № 11 (целый, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8); 8, 9, 10, 11 — разведения экстракта гипернефroidного рака № 15 (целый, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8).

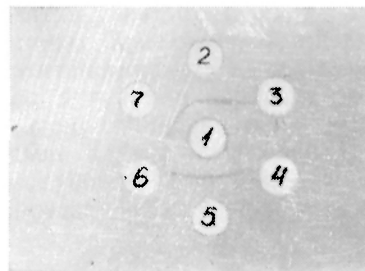


Рис. 2. Иммунохимический анализ АУС-2 в экстрактах гипернефroidного рака в тканях человека.

1 — моноспецифическая антисыворотка к АУС-2; 2, 5 — экстракт селезенки взрослого человека; 3 — экстракт почки; 4 — экстракт печени человека; 6 — сыворотка донора; 7 — экстракт гипернефroidного рака.

Между тем антигены широкой специфичности, такие, как АГШ-2 и АГШ-3, были обнаружены нами не только во всех нормальных индивидуальных образцах почек, но и в опухолевых тканях почек. Правда, в отдельных случаях гипернефroidного рака АГШ-2 (рис. 1) и АГШ-3 были

обнаружены нами соответственно в 5 из 46 и в 1 из 30 проб. Следует обратить внимание на то, что во всех пробах гипернефроидного рака и опухолей Вильмса общее содержание антигенов узкой и широкой специфичности уменьшено по сравнению с содержанием их в нормальных тканях.

Что касается «селезеночного» антигена (АУС-2), то он не обнаруживался в экстрактах нормальных почек, в то время как в половине случаев опухолевых тканей почек (см. таблицу) этот антиген был обнаружен (рис. 2). Содержание АУС-2 в селезенке колебалось в пределах 1 : 2—1 : 8, а в опухолевой ткани почки — 1 : 1—1 : 8. Этот антиген был обнаружен также в экстрактах опухолевых тканей мозга, аденокарциномы желудка, прямой кишки, злокачественных опухолей яичников, светлоклеточного рака легких и раке молочной железы. Кроме того, АУС-2 может быть выявлен при иммунодиффузионном анализе в сыворотке крови при гипернефроидном раке (в 3 из 12 случаев) и при нефробластоме (в 13 из 27 случаев). Эти данные показывают, что в опухолевых тканях почек может возобновляться биосинтез дивергирующего антигена.

Таким образом, опухолевая ткань характеризуется снижением и утратой синтеза некоторых тканевых антигенов, а также появлением антигенов, не свойственных дефинитивной ткани, т. е. дивергирующих антигенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дэй Ю. (Day E.) Иммунохимия рака. М., 1966. — 2. Weiler E. — Z. Naturforsch., 1952, Bd 7, S. 324—327. — 3. Храмова Н. И. — В кн.: Иммунохимический анализ. М., 1968, с. 143—164. — 4. Фель В. Я., Швембергер И. И. — В кн.: Клеточная наследственность и злокачественный рост. М. — Л., 1966, с. 135—145. — 5. Авдеев Г. И. — Вопр. онкол., 1974, № 2, с. 36—40. — 6. Абелев Г. И. — В кн.: Международный противораковый конгресс. 13-й. — Труды. М., 1963, т. 3, с. 224—227. — 7. Татарinov Ю. С. — В кн.: Всесоюзный биохимический съезд. Л., 1963, т. 2, с. 274. — 8. Храмова Н. И., Абелев Г. И. — Бюлл. exper. биол., 1961, № 12, с. 107—111. — 9. Grabar P., Williams G. A. — Biochim. biophys. Acta, 1953, v. 10, p. 193. — 194. — 10. Основы иммуноэмбриологии. Под ред. О. Е. Вязова. М., 1973.

Поступила 27/VII 1978 г.

IMMUNOCHEMICAL STUDY OF α -GLOBULINS FROM HUMAN KIDNEY TUMORS.

Z. M. Pchelkina, B. P. Matveev, E. I. Rykunov, A. A. Terent'ev, Yu. S. Tatarinov

Chair of Biochemistry, N. I. Pirogov II Medical School, Oncological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Four individual tissue proteins were studied both in normal and tumoral tissue of kidney (hypernephroma, Wilms tumor) using immunochemical analysis. Occurrence of an antigen, which was absent in definitive tissue of homologous origin, as well as a decrease in biosynthesis of some homologous antigens were found in malignant tissue.

УДК 612.46.015.13:577 152.344

А. П. Плетень, И. А. Учитель, В. К. Мазо, С. И. Никуличева,
Л. И. Волкова, В. А. Шатерников

ВЫДЕЛЕНИЕ РЕНИНА ИЗ ПОЧЕК ЧЕЛОВЕКА

Научно-исследовательский институт по стандартизации и контролю лекарственных средств Министерства здравоохранения СССР, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Всесоюзный научно-исследовательский институт кардиологии им. А. Л. Мясникова АМН СССР, Москва

Осуществлена частичная очистка ренина из почек человека с использованием хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и аффинной хроматографии на иммобилизованном пепстатине. Активность выделенного препарата составила $1,1 \text{ GU}^1$ на 1 мг белка.

¹ Гольдблаттовская единица (GU) соответствует такому количеству ренина, которое даст увеличение кровяного давления у собак на 30 мм рт. ст.

Ренин относится к классу кислых протеаз. Он секретируется в кровь юктагломерулярными клетками, находящимися в корковом слое почек [1]. В результате взаимодействия с присутствующим в крови ангиотензиногеном образуется ангиотензин I, который под действием конвертирующего фермента расщепляется до ангиотензина II, обладающего вазопрессорным действием и участвующего в регуляции водно-солевого баланса в организме [2]. Для анализа роли системы ренин — ангиотензин в развитии артериальной гипертонии необходимо иметь возможность определять в крови у пациентов концентрации ренина и его субстрата — ангиотензиногена [3]. Для

Выделение ренина из почек человека

Стадия выделения	Удельная активность GU/мг белка $\times 10^5$	Выход по активности	Степень очистки
I. Делипидизация почечного материала	16	100	3*
II. Экстракция метилцеллозольвом	—	—	—
III. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	180	54	36
IV. Аффинная хроматография на иммобилизованном пепстатине	10 000	9	2000

* Согласно работе [7], удельная рениновая активность почек человека составляет 5×10^{-5} GU на 1 мг белка.

определения этих компонентов необходимы препараты очищенного человеческого ренина. С этой целью в настоящей работе было проведено выделение ренина из почек человека и определена активность полученного препарата.

Методика

Активность ренина в образцах определяли по ангиотензину, образующемуся при взаимодействии ренина с его природным субстратом — ангиотензиногеном. В качестве субстрата использовали препарат ангиотензиногена, выделенный нами из плазмы крови свиньи по методу [4] (содержание собственно ангиотензиногена — 0,4%). 10 мг порошка ангиотензиногена растворяли в 1,0 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 7,4, а затем доводили раствор до 2,0 мл изотоническим раствором. К 1,0 мл полученного раствора субстрата добавляли 2,0 мл исследуемой пробы ренина и полученную смесь доводили 0,5 н. NaOH (1—2 капли) до pH 8,0. Инкубацию смеси вели в течение $1\frac{1}{2}$ ч при 37°C. После инкубации pH смеси доводили 0,2 н. HCl (0,2 мл) до 5,5 и фермент инактивировали нагреванием пробы на кипящей водяной бане в течение 3 мин. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (20 мин 7000 об/мин). К надосадочной жидкости (2 мл) добавляли 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4 (1—2 капли) до pH 7,0. Образующийся ангиотензин определяли непрямым биологическим методом на крысах по повышению кровяного давления [5] и радиоиммунным методом [6]. В качестве стандарта использовали международный стандартный образец ренина из почек человека².

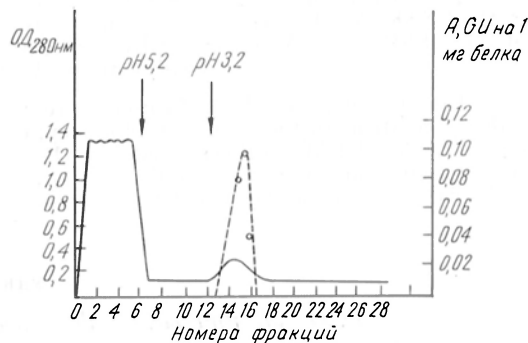
Получение очищенных препаратов ренина из почек человека представляет собой весьма трудоемкую задачу, что прежде всего связано с чрезвычайно низким содержанием этого фермента в ткани почек. Согласно работе [7], удельная рениновая активность ткани почек человека составляет 5×10^{-5} GU на 1 мг белка.

Выделение ренина проводили из человеческих почек (секционного материала) по методике, разработанной для выделения и очистки свиного ренина [8] с некоторыми модификациями. Почки замораживали при -20°C , а затем после частичного оттаивания при комнатной температуре освобождали от капсул и жировой ткани, далее измельчали и лиофильно высушивали. Всушенный препарат растирали в порошок и делипидизировали эфиром (5 л \times 3) в течение 30 мин. Делипидизированный порошок высушивали на воздухе при комнатной температуре и хранили при -20°C . Удель-

² Международный стандарт ренина из почек человека № 68/356, получен из лаборатории биологических стандартов Национального института для биологических стандартов и контроля (Англия).

ная активность порошка составляла 16×10^{-5} GU на 1 мг белка (см. таблицу). Затем 100 г порошка экстрагировали 16 л 30% (V/V) раствора метилцеллозольва в воде. К раствору добавляли ингибиторы протеаз: диизопропилфторфосфат (0,05 мМ), тетрагидрат натрия (5 мМ), трилон Б (5 мМ), фенилметилсульфонилфторид (2 мМ)³. Необходимость применения ингибиторов при очистке ренина была убедительно показана в работе [9]. Смесь встряхивали на холоду в течение 60 мин. Осадок отделяли центрифугированием (20 мин 5000 об/мин). Ренин из экстракта адсорбировали на ДЭАЭ-целлюлозе в течение 40 мин (100 г ДЭАЭ-целлюлозы переводили в OH^- форму и затем уравнивали 0,001 М фосфатным буфером pH 7,0). ДЭАЭ-целлюлозу промывали на воронке Бюхнера разведенным раствором уксусной кислоты (pH 5,3) в те-

Аффинная хроматография сульфатно-аммонийной фракции ренина на пепстатин-аминогексилсефарозном геле. Колонка (1,5 × 2,0 см) была уравнирована 0,1 М трис-HCl-буфером pH 7,5, содержащим 0,1 М хлористый натрий. После нанесения образца колонка была промыта 0,02 М ацетатным буфером pH 5,2, содержащим 1,0 М хлористый натрий, до исчезновения в элюате белкового материала. Фракции, содержащие ренин, элюировали 0,1 М уксусной кислотой pH 3,2. Пунктиром обозначена удельная активность.



ние 30 мин. Ренин элюировали 0,1 М ацетатным буфером pH 4,8, содержащим хлористый натрий, 0,2 М (два раза по 400 мл). Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе позволила освободиться от ряда белков и повысила удельную активность препарата в 36 раз. Далее выделяли белковую фракцию, осаждающуюся при 75% насыщения сульфатом аммония. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (20 мин 7000 об/мин) и растворяли в 40 мл 0,1 М трис-HCl-буфера pH 7,5. Полученный белковый раствор диализовали в течение ночи против 1,6 л 0,01 М трис-HCl-буфера (со сменой буфера). После диализа раствор подкисляли 0,5 н. HCl до pH 5,2 и выпавший осадок отделяли центрифугированием (20 мин 5000 об/мин). Раствор после доведения pH до 6,5 1 н. NaOH наносили на колонку с иммобилизованным пепстатином⁴. На рисунке представлена выходная кривая ренина при аффинной хроматографии на иммобилизованном пепстатине. Как видно из рисунка, активная рениновая фракция выходит одним пиком при элюции 0,1 М уксусной кислотой (pH 3,2). Очистка ренина на колонке с иммобилизованным пепстатином позволяет добиться значительного увеличения удельной активности препарата за одну стадию. Эффективность пепстатина в качестве аффинного сорбента для ренина обусловлена его высокой ингибирующей активностью ($K_i \sim 10^{-10}$ М) [10].

Полученный препарат имел активность 0,1 GU/мг белка. Достигнутая степень очистки препарата позволяет использовать его для определения концентрации ренина и ангиотензиногена в плазме крови радиоиммунным методом.

Авторы выражают благодарность зав. лабораторией химии ферментов Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР проф. В. К. Антонову и сотруднику этой же лаборатории доктору хим. наук Л. М. Гиодману за ценные советы и за обсуждение результатов данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vagermark J., Ungerstedt U., Ljunqvist A. — *Circulat. Res.*, 1968, v. 22, p. 149. — 2. Лилас Я. П., Чипенс Г. И. — В кн.: Химия и биология пептидов. Рига, 1971, с. 113. — 3. Ратнер Н. А. Болезни почек и гипертензия. М., 1971. — 4. Sen S., Smeby R. R., Vitrus F. M. — *Biochemistry* (Wash.), 1967, v. 6, p. 2978. — 5. Серебровская Ю. А., Учитель И. А. — *Лаб. дело*, 1970, № 7, с. 421. — 6. Haber E., Koerner T., Page L. B. et al. — *J. clin. Endocr.*, 1969, v. 29, p. 1349. — 7. Helmer O. M. — In: Fisher James W. *Kidney Hormones*. London, 1971, p. 59. — 8. Murakami K., Inagami T. — *J. biol. Chem.*, 1977, v. 252, p. 2978. — 9. Murakami K.,

³ На стадиях элюции 0,1 М ацетатным буфером и диализа вышеперечисленные ингибиторы использовали в концентрации в 20 раз меньшей.

⁴ Пепстатин был иммобилизован путем ковалентного связывания с гексаметиламиносефарозой по методу [9].

J n a g a m i T. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1975, v. 62 p. 757. —
10. M e K o w n M. M., W o r k m a n R. J., G r e g e r m a n R. J. — J. biol.
Chem., 1974, v. 249, p. 7770.

Поступила 28/VII 1978 г.

ISOLATION OF RENIN FROM HUMAN KIDNEY

A. P. Pleten, I. A. Uchitel, V. K. Mazo, S. I. Nikuliceva, L. I. Volkova,
V. A. Shaternikov

Research Institute for Standardization and Control of Drugs, Ministry of Public Health
of the USSR, M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, A. L. Myasnikov All-Union Institute of Cardiology, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow

Isolation and partial purification of renin from human kidney was carried out as
follows: defatting of the homogenized kidney; extraction with methyl cellosolve; chroma-
tography on DEAE cellulose; affinity chromatography using immobilized pepstatin.
Activity of the preparation obtained was 0.1 GU/mg of protein. The preparation
of human renin might be used for measurement of renin activity in blood of patients.

УДК 615.31:547.814.5].015.42:[612.123+612.351.1

Т. П. Леонтьева, А. Л. Казаков, В. Е. Рыженков

ВЛИЯНИЕ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ КЛЕВЕРА КРАСНОГО И НУТА ОБЫКНОВЕННОГО НА СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ В КРОВИ И ПЕЧЕНИ КРЫС

Лаборатория экспериментальной фармакотерапии отдела биохимии липидов и атеро-
склероза Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

*Суммы флавоноидов из клевера красного и нута обыкновенного, содержащие изо-
флавоны, снижают содержание холестерина и триглицеридов у интактных крыс
задерживают развитие гиперлипидемии, вызванной тритоном WR-1339, препятству-
ют нарастанию уровня триглицеридов в крови и печени крыс, наблюдавшемуся под
влиянием введения этанола. Суммы флавоноидов из клевера красного и нута обыкно-
венного угнетают липолиз, стимулированный адреналином.*

Рядом авторов установлено, что некоторые флавоноидные соединения
обладают способностью нормализовать нарушенный липидный обмен и
оказывать антиатеросклеротическое действие в эксперименте [1—3]. Среди
флавоноидов изофлавоны занимают значительное место [4], однако их влия-
ние на липидный обмен изучено недостаточно [5]. Изофлавоны наиболее
представлены в растениях семейства бобовых, многие из последних ши-
роко распространены на территории Советского Союза.

В данной работе изучено действие суммы флавоноидов из клевера крас-
ного и нута обыкновенного, содержащих изофлавоны, на уровень холесте-
рина и триглицеридов в крови и печени интактных крыс, а также в усло-
виях гиперлипидемии, вызванной введением тритона WR-1339 и этанола.
Исследовано также их влияние на липолиз, стимулированный адреналином.

Названные суммы флавоноидов получены на кафедре органической
химии Пятигорского фармацевтического института. Сумма флавоноидов
из клевера красного содержит изофлавоны: формонетин, ононин, био-
ханин А и прунетин, сумма флавоноидов из нута обыкновенного — формо-
нетин, биоханин А и их гликозиды.

Методика

Исследования проведены на крысах-самцах массой 200—300 г, получавших
стандартный рацион. Изучаемые вещества вводили из расчета 200 мг/кг пер ос в те-
чение 10 дней. В опытах с тритоном WR-1339 вещества вводили внутривенно за
24 ч до применения тритона и одновременно с ним. Тритон инъецировали внутривенно
в дозе 225 мг/кг. Для сравнения изучали мисклерон (вводили в дозе 200 мг/кг).

Этанол использовали в виде 50% раствора в течение 3 дней в дозе 2,4 и 6 г/кг последовательно. Адреналин применяли из расчета 1,5 мг/кг внутривенно. Указанные вещества крысы получали пер ор os в течение 3 дней, последний раз — за 30 мин до инъекции адреналина. LD₅₀ определяли в опытах на мышах при внутривенном и пероральном введении. В дозах 3—3,5 г/кг токсического действия не установлено. Количество общего холестерина [6] и триглицеридов [7] определяли в сыворотке крови и печени, содержание неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) — в сыворотке крови [8]. Полученные результаты обработаны статистически [9].

Т а б л и ц а 1

Содержание липидов в сыворотке крови (в мг%) и печени (в мг/г) крыс

Группа животных	Холестерин		Триглицериды	
	в сыворотке крови	в печени	в сыворотке крови	в печени
Интактные (n=10)	63,0±3,3	2,16±0,26	42,8±4,5	8,2±0,15
Получавшие сумму флавоноидов: из клевера красного (n=10)	48,3±1,6***	1,85±0,7	30,8±3,0*	6,9±0,13***
из пута обыкновенного (n=10)	42,5±2,2***	1,84±0,2	26,4±2,3***	6,7±0,15***

* P<0,05.

** P<0,01.

*** P<0,001 в сравнении с интактными крысами.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, введение суммы флавоноидов в течение 10 дней интактным крысам приводило к снижению уровня холестерина и триглицеридов в сыворотке крови и триглицеридов в печени.

Т а б л и ц а 2

Влияние суммы флавоноидов из клевера красного и пута обыкновенного на гиперлипидемию у крыс, вызванную введением тритона WR-1339 и этанола

Группа животных	Холестерин		Триглицериды	
	в сыворотке, мг%	в печени, мг/г	в сыворотке, мг%	в печени, мг/г
Тритон (1-я, n=7)	329±23,2	—	485±4,9	—
Сумма флавоноидов из клевера красного + тритон (2-я, n=7)	151,4±5,6*	—	222,8±9,6*	—
Сумма флавоноидов из пута обыкновенного + тритон (3-я, n=7)	140,8±5,7*	—	129,5±2*	—
Мисклерон + тритон (4-я, n=7)	185,5±6,2*	—	280,8±13,9*	—
Этанол (5-я, n=6)	—	—	193,6±7,7	10,2±1,6
Сумма флавоноидов из клевера красного + этанол (6-я, n=6)	—	—	114±5,6**	7,7±0,34
Сумма флавоноидов из пута обыкновенного + этанол (7-я, n=6)	—	—	97,1±3,5**	5,2±0,1***

* P<0,001 в сравнении с 1-й группой.

** P<0,001.

*** P<0,05 в сравнении с 5-й группой.

В условиях гиперлипидемии, развивающейся под влиянием тритона WR-1339, введение суммы флавоноидов обусловило задержку развития гиперлипидемии, уменьшило содержание холестерина и триглицеридов.

Гиполипидемическое действие этих соединений было более выраженным, чем мисклерона (табл. 2).

Из данных табл. 2 видно, что под влиянием этанола у крыс возрастало содержание триглицеридов в сыворотке крови, в печени отмечалась отчетливая тенденция к увеличению их количества. Введение суммы флавоноидов из клевера красного и нута обыкновенного препятствовало нарастанию концентрации триглицеридов в сыворотке крови, вызванному введением этанола. Под влиянием суммы флавоноидов из нута обыкновенного наблюдалось также отчетливое снижение содержания триглицеридов в печени.

Для выяснения влияния изученных веществ на липолиз проведены опыты с изучением содержания НЭЖК в крови интактных крыс и в условиях стимулированного адреналином липолиза. Как видно из табл. 3, количества НЭЖК в сыворотке крови крыс, получавших физиологический раствор или суммы изофлавонов, существенно не различались.

Т а б л и ц а 3

Влияние суммы изофлавонов на содержание НЭЖК (в мэкв/л) в сыворотке крови крыс ($M \pm m$)

Группа животных	НЭЖК	<i>p</i>
Физиологический раствор (1-я, $n=6$)	390,2 \pm 28,5	—
Сумма изофлавонов из клевера красного (2-я, $n=6$)	410,3 \pm 18,2	—
Сумма изофлавонов из нута обыкновенного (3-я, $n=6$)	350,5 \pm 20,9	—
Адреналин (4-я, $n=6$)	653,1 \pm 23,8	<0,001 (1—4)
Сумма изофлавонов из клевера красного + адреналин (5-я, $n=6$)	515,0 \pm 6,6	<0,001 (4—5)
Сумма изофлавонов из нута обыкновенного + адреналин (6-я, $n=6$)	351,1 \pm 17,3	<0,001 (4—6)

В условиях стимуляции мобилизации НЭЖК, вызванной адреналином, изученные вещества оказывали угнетающее действие. Особенно отчетливым был эффект суммы изофлавонов из нута обыкновенного.

Таким образом, опыты показали, что изученные суммы изофлавонов, обладающие низкой токсичностью, оказались эффективными в снижении уровня липидов крови как у интактных крыс, так и в условиях гиперлипидемии, вызванной введением тритона WR-1339 или этанола. При этом более выраженной была активность суммы изофлавонов из нута обыкновенного, которая проявилась и в значительном угнетении липолиза, стимулированного адреналином. Следует отметить, что у интактных крыс под влиянием суммы изофлавонов из нута обыкновенного наблюдалась отчетливая тенденция к уменьшению содержания НЭЖК в крови. Возможно, с антилипидическим влиянием данного соединения в определенной степени связано его гиполипидемическое действие.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ш а м р а й Е. Ф. — Врач. дело, 1970, № 4, с. 37. — 2. Л и с е в и ц к а я Л. И., Ш и н к а р е н к о А. Л. и др. — В кн.: Актуальные вопросы фармакологии. Пятигорск, 1968, с. 176. — 3. D i M a g g i o E. — Arch. ital. Sci. farmacol., 1967, v. 7, p. 369. — 4. Х а р б о р н Дж. Биохимия фенольных соединений. М., 1968. — 5. Л и с е в и ц к а я Л. И., Б а н д ю к о в а В. А. и др. — Науч. докл. высш. школы. Биол. науки, 1972. — 6. B r a g d o n J. H. — In: Lipids and the Steroid Hormones in Clinical Medicine. Philadelphia, 1960, p. 6. — 7. N e r i B., F r i n g s C. — Clin. Chem., 1973, v. 19, p. 1201. — 8. I t a y a K., U i M. — J. Lipid. Res., 1965, v. 6, p. 16. — 9. Б е л е н ь к и й М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1963.

Поступила 2/VIII 1978 г.

EFFECT OF TOTAL FLAVONOIDS FROM TRIFOLIUM PRATENSE AND BERTOLLETIA HUMB ON CONTENT OF LIPIDS IN RAT LIVER TISSUE AND BLOOD

T. P. Leont'eva, A. L. Kazakov, V. E. Ryzenkov

Laboratory of Experimental Pharmacotherapy, Department of Lipid Biochemistry and Atherosclerosis, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Total flavonoids from clover red and nut, containing isoflavones, decreased the content of cholesterol and triglycerides in intact rats, inhibited the development of hyperlipidemia, caused by Triton WR-1339, prevented accumulation of triglycerides in rat liver and blood caused by ethanol administration. The flavonoids from these plants inhibited lipolysis, stimulated by adrenaline.

УДК 612.015.6:577.164.2].015.1-087.4

А. М. Герасимов, Л. А. Королева, Л. И. Иванова, Л. Ф. Панченко

ГЛУТАТИОН: ДЕГИДРОАСКОРБАТ-ОКСИДОРЕДУКТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ТКАНЕЙ КРЫС

Кафедра биохимии медико-биологического факультета II Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова

Получены данные, свидетельствующие о ферментной природе глутатион: дегидроаскорбат-оксидоредуктазной активности (ГДАР-А) печени крысы, и установлено ее наличие в сердце, селезенке, легких и клетках гепатомы Зайделя. Отмечена корреляция между активностью глутатионредуктазы и ГДАР во всех исследованных органах. В гепатоме Зайделя соотношение глутатионредуктаза/глутатион: дегидроаскорбат-оксидоредуктаза более высокое, чем в печени крысы. Обсуждается роль глутатион: дегидроаскорбат-оксидоредуктазы в антиокислительной защите клеток и процессах клеточного деления.

В растительных тканях [1] присутствует глутатион: дегидроаскорбат-оксидоредуктаза (КФ.1.8.5.1) катализирующая образование аскорбиновой кислоты из дегидроаскорбиновой за счет окисления восстановленного глутатиона. Подобный «дегидроаскорбат-оксидоредуктазный фактор» был обнаружен в различных тканях морской свинки [2], в организме которой, как известно, аскорбиновая кислота не синтезируется, а также в печени крысы и кролика [3]. Частично очищенный препарат, обладающий глутатион: дегидроаскорбат-оксидоредуктазной активностью (ГДАР-А), был выделен из желудка, кишечника и печени морской свинки [2].

Ранее нами было показано наличие ГДАР-А в мозге и печени крыс [4]. В настоящей работе приведены данные, свидетельствующие о ферментной природе ГДАР-А, обнаружено присутствие ее в различных тканях крыс

Методы исследования

Использовали белых беспородных крыс массой 150—200 г, содержавшихся на стандартном рационе вивария. Крыс декапитировали и перфузировали печень через нижнюю полую вену 0,25 М сахарозой с 2 мМ ЭДГА и 25 мМ трис-НСl, pH 7,4. Измельченную ткань печени гомогенизировали в гомогенизаторе типа Даунса (стекло/тефлон) в том же растворе при соотношении объема к навеске 9 : 1. Гомогенат фильтровали через несколько слоев марли. Для получения цитозоля гомогенат центрифугировали при 105 000 g 60 мин и надосадок исследовали. В ряде экспериментов цитозоль освобождали от низкомолекулярных веществ гель-фильтрацией на колонке с сефадексом Г-25. Гомогенаты сердца, селезенки и легких готовили без предварительной перфузии органов. Перфузию печени не проводили и в экспериментах по исследованию активности ферментов в расчете на 1 г сырой массы ткани. Штамм асцитной гепатомы Зайделя был получен в Онкологическом научном центре АМН СССР. Клетки выделяли и отмывали по способу, описанному в работе [5], и гомогенизировали так же, как ткань печени.

Активность глутатионредуктазы и ГДАР-А исследовали, как описано ранее [4], и рассчитывали в микромолях НАДФН в минуту. В ряде экспериментов для исследова-

дования ГДАР-А использовали микромодификацию метода. При этом в кювету объемом 1 мл вносили 0,5 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 1 мМ ЭДТА, и по 0,1 мл пробы и 10 мМ восстановленного глутатиона, 1,2 мМ НАДФН, 30 мМ дегидроаскорбиновой кислоты, раствора глутатионредуктазы (1 ед. в 0,1 мл). Для проведения исследования в бескислородных условиях буферный раствор насыщали азотом. Активность измеряли в герметически закрытых спектрофотометрических кюветах. Использовали спектрофотометр и приспособления фирмы «Гилфорд», модель 240. При исследовании зависимости ГДАР-А от рН использовали 50 мМ калий-фосфатный буфер. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена и достоверность рассчитывали по Е. В. Гублеру, А. А. Генкину [6].

Результаты и обсуждение

Некоторые характеристики ГДАР-А цитозоля печени крыс. Глутатион и аскорбиновая кислота подвержены автоокислению в аэрированных растворах. В связи с этим можно было ожидать, что при наличии этих веществ в реакционной смеси возникнут сложные свободнорадикальные процессы, приводящие в конечном счете к окислению глутатиона опосредованно, а не за счет прямой реакции с дегидроаскорбиновой кислотой.

При условиях определения, описанных выше, исключение кислорода из реакционной смеси не вызывало уменьшения ГДАР-А цитозоля печени крыс, очищен-

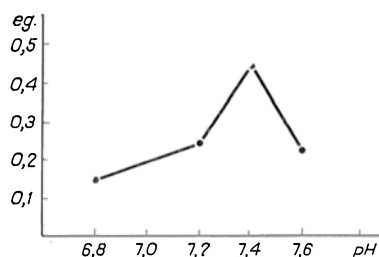


Рис. 1. pH-зависимость ГДАР-А цитозоля печени крысы.

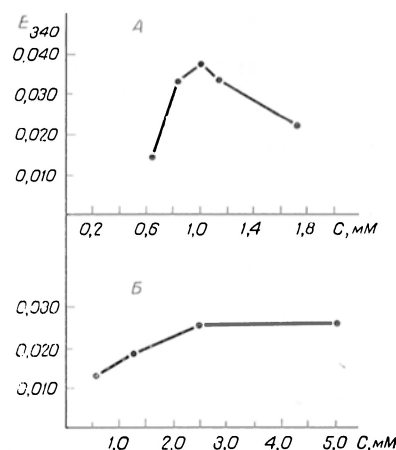


Рис. 2. Зависимость ГДАР-А цитозоля печени крысы от концентрации глутатиона (А) и дегидроаскорбата (Б) в кювете.

По осям абсцисс — конечная концентрация восстановленного глутатиона (А) или дегидроаскорбата (Б) в кювете; по оси ординат — изменение оптической плотности за 1 мин (за вычетом скорости неферментативной реакции). А — 5 мМ дегидроаскорбата, Б — 1,0 мМ глутатиона.

ного на сефадексе Г-25. Это является серьезным аргументом в пользу того, что регистрируемое окисление глутатиона дегидроаскорбиновой кислотой в присутствии цитозоля не опосредовано какими-либо кислородзависимыми реакциями. Инкубация цитозоля в течение 10 мин при 60°C, так же как и кислотная обработка (HCl, рН 5,0), приводила к полной потере активности. Не наблюдалось потери активности при диализе цитозоля на холоду в течение 24 ч против 0,05 М калий-фосфатного буфера, рН 7,4. Этанольная преципитация (50%, объем/объем) на холоду с последующим диализом сопровождалась повышением специфической активности в 3—4 раза. Более высокие концентрации этанола давали ингибирующий эффект. Фракционирование белков цитозоля сульфатом аммония показало, что более 80% активности осаждается во фракции между 30 и 60% насыщения. ГДАР-А цитозоля печени крыс имеет выраженную pH-зависимость с максимумом при рН 7,4 (рис. 1). Реакция ингибируется избытком глутатиона (рис. 2, А), но не дегидроаскорбата (рис. 2, Б).

В целом полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что ГДАР-А печени крыс имеет ферментную природу.

Глутатион: дегидроаскорбат-оксидоредуктазная активность тканей крысы. Более 80% ГДАР-А гомогената печени крысы остается в цитозоле, полученном путем центрифугирования при 105 000 g в течение часа. Локализация в растворимой фазе клетки и довольно высокая специфическая активность (табл. 1) позволяют предположить, что эта реакция является

Т а б л и ц а 1

ГДАР-А в различных тканях крыс

Орган	Число опытов	Активность, мкмоль/мин	
		на 1 г ткани	на 1 мг белка
Печень	20	7,93±0,47	0,053±0,010
Почки	13	10,00±0,88	0,053±0,008
Сердце	15	8,78±0,61	0,067±0,009
Селезенка	10	5,16±0,37	0,041±0,008
Легкие	20	2,50±0,31	0,032±0,004

важным звеном цитозольной ферментной редокс-системы глутатиона. В пользу этого свидетельствует также тесная корреляция между активностью глутатионредуктазы и ГДАР в исследованных тканях крысы (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Корреляция между активностью глутатионредуктазы и ГДАР-А: в различных тканях крыс

Орган	Число животных	Коэффициент корреляции Спирмена	P
Печень	13	+0,813	<0,0005
Почки	7	+0,677	<0,05
Сердце	7	+0,445	>0,05
Селезенка	8	+0,672	<0,05
Легкие	21	+0,665	<0,0005
Гепатомы Зайделя:			
4 сут	14	-1,29	<0,001
6 »	8	+0,924	<0,001
8 »	8	+0,75	<0,01

Физиологическая роль ГДАР-реакции в клетках животных в первую очередь должна рассматриваться в аспекте функционального единства глутатиона и аскорбиновой кислоты. Оба вещества известны [8—10] как важнейшие водорастворимые биоантиоксиданты. Исходя из этого можно с полным основанием отнести глутатион: дегидроаскорбат-оксидоредуктазу к группе «антирадикальных» [11] ферментов системы антиокислительной защиты клетки.

Т а б л и ц а 3

Изменения ГДАР-А в гепатоме Зайделя

Время, прошедшее после перевивки, сут	Число опытов	Активность, мкмоль/мин	
		на 1 мг белка	на 1 мг ДНК
4	14	0,023±0,003	0,047±0,009
6	8	0,061±0,007	0,216±0,069
8	8	0,027±0,012	0,087±0,018

Важная роль глутатиона в процессах клеточного деления общепризнана, хотя конкретный биохимический механизм его эффектов остается неизвестным [12, 13]. Дегидроаскорбиновая кислота, согласно гипотезе Эдгара [14], является ингибитором клеточного деления. Естественно предположить, что регуляция уровня этих метаболитов в клетке за счет ГДАР-

реакции может быть важным механизмом контроля митотической активности.

Изменения ГДАР-А в клетках асцитной гепатомы Зайделя. Как видно из табл. 3, ГДАР-А в гепатоме изменяется в процессе роста опухоли. На 4-й день после прививки активность в гепатоме в 2 раза ниже, чем в печени интактных животных. Позднее ГДАР-А в опухоли повышается, но не достигает уровня, наблюдаемого в печени (при расчете на ДНК). В период максимального развития асцита (8-е сутки) ГДАР-А снижается. Весьма интересно, что в процессе развития опухоли отрицательная корреляционная связь между активностью глутатионредуктазы и ГДАР в начальной фазе сменяется на прямую в более поздний период (см. табл. 2). При этом соотношение активности глутатионредуктазы и ГДАР через 4 и 8 сут после перевивки опухоли примерно в $1\frac{1}{2}$ раза выше, чем в нормальной печени. Таким образом, в гепатоме по сравнению с печенью оказывается сниженной ГДАР-А и повышается соотношение активность глутатионредуктазы: ГДАР-А.

Если допустить, что эти характеристики отражают метаболическую потребность гепатомы, то можно думать о преобладании в опухолевой клетке процесса восстановления глутатиона над его окислением дегидроаскорбатом. В определенной мере это заключение согласуется с предположением Эдгар [14], что повышение содержания восстановленного глутатиона должно вести к снижению уровня дегидроаскорбиновой кислоты и тем самым к стимуляции клеточного деления. Однако было бы преждевременным рассматривать приведенные данные как экспериментальное подтверждение исключительной роли дегидроаскорбиновой кислоты [14] в контроле митотической активности клеток.

ГДАР-А является одним из нескольких механизмов окисления глутатиона в клетке [9]. Приведенные данные об относительном уменьшении мощности дегидроаскорбат-оксидоредуктазного пути окисления глутатиона в гепатоме согласуются с фактами повышения соотношения глутатионредуктаза: глутатионпероксидаза в опухолях [15, 16] и его снижения при действии сарколизина [17] и тем самым подтверждают важную роль восстановленного глутатиона в стимуляции клеточного деления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yamaguchi M., Joslyn M. A. — Arch. Biochem., 1952, v. 38, p. 451.
2. Grimbble R. F., Hughes R. E. — Experientia, 1967, v. 23, p. 362.
3. Hughes R. E. — Nature, 1964, v. 203, p. 1068.
4. Герасимов А. М., Королева Л. А., Брусов О. С. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1976, № 1, с. 89.
5. Давыдова С. Я. — *Биохимия*, 1968, т. 33, с. 685.
6. Гублер Е. В., Генкин А. А. — *Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях*. Л., 1973.
7. Hopkins F. G., Morgan E. J. — Biochem. J., 1936, v. 30, p. 1446.
8. Tarpeil A. L. — Vitam. and Horm., 1962, v. 20, p. 493.
9. Герасимов А. М. — В кн.: *Проблемы молекулярной и клеточной патологии и фармакологии*. М., 1973, с. 53.
10. Журавлев А. И. — В кн.: *Биоантиокислители*. (Труды МОИП). М., 1975, с. 15.
11. Герасимов А. М., Панченко Л. Ф., Косен Я. М. и др. — Докл. АН СССР, 1974, т. 216, с. 1175.
12. Harington J. S. — Advanc. Cancer Res., 1967, v. 10, p. 247.
13. Holmgren A. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 2275.
14. Edgar J. A. — Nature, 1970, v. 227, p. 24.
15. Taniguchi N., Tsukada Y., Gitai H. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 354, p. 161.
16. Pinto R. E., Bartley W. — FEBS Lett., 1974, v. 32, p. 307.
17. Бабушкин В. А., Архангельская Л. В., Герасимов А. М. — *Бюлл. экспер. биол.*, 1977, т. 84, с. 597.

Поступила 16/VIII 1978 г.

ACTIVITY OF GLUTATHIONE: DEHYDROASCORBATE REDUCTASE IN RAT TISSUES

A. M. Gerasimov, L. A. Koroleva, L. I. Ivanova, L. F. Panchenko

Chair of Biochemistry, Medico-Biological Faculty, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Glutathione: dehydroascorbate reductase activity was studied in rat liver, heart, spleen, lungs as well as in Zajdela hepatoma. Correlation between the activities of glutathione reductase and glutathione: dehydroascorbate reductase was observed in all the tissues studied. Glutathione: dehydroascorbate reductase activity was higher in Zajdela hepatoma as compared with the rat liver. The role of glutathione: dehydroascorbate reductase in regulation of antioxidative activity and of cell division is discussed.

УДК 616.36-008.949.5:665.44]-074

Л. Ф. Дмитриев, И. И. Иванов

О РАСПРЕДЕЛЕНИИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ В КЛЕТКЕ В АКТИВНОЙ ФАЗЕ МЕТАБОЛИЗМА БЕНЗ(a)ПИРЕНА

Кафедра биофизики биологического факультета Московского университета им. М. В. Ломоносова

Гидроксилирование бенз[a]пирена в печени может проходить в условиях пониженной активности НАДФ-Н-зависимой редуктазы. Снижение активности НАДФ-Н-зависимой редуктазы, по-видимому, не снижает интенсивности гидроксилирования бенз[a]пирена; гидроксилирование канцерогена поддерживается за счет перераспределения восстановительных эквивалентов между оксигеназной и оксидазной системой клетки. Рассмотрено антиканцерогенное действие двух различных соединений — хризена и убихинона — с единой точки зрения; в плане нормализации НАД-Н- и НАДФ-Н-зависимых реакций в клетке.

Метаболизм бенз[a]пирена в печени идет в основном по пути гидроксилирования при участии ферментных систем, связанных преимущественно с НАДФ-Н. Известно, что образующиеся в результате гидроксилирования оксипроизводные бенз[a]пирена неканцерогенны. В то же время существует прямая зависимость между эффективностью канцерогенного действия бенз[a]пирена и интенсивностью его метаболизма в клетке [1].

Для разрешения этого противоречия, по-видимому, требуется всесторонний анализ взаимодействия канцерогена с системой, осуществляющей его метаболизм. Такое взаимодействие определяет развитие канцерогенеза, причем наряду с образованием активной формы канцерогена важным является изучение процесса инактивации канцерогена, который сопровождается кратковременным, но значительным увеличением энергетических затрат.

Ранее нами было высказано предположение, что метаболизм бенз[a]пирена связан с перераспределением восстановительных эквивалентов в клетке [2]. Вполне возможно, что проканцерогенный эффект гидроксилирования является результатом перераспределения НАД-Н между системами, локализованными внутри разных субклеточных элементов. Участие НАД-Н в гидроксилировании бенз[a]пирена возможно, в частности, в случае, когда ограничен транспорт электронов через НАДФ-Н-зависимый флавопротеид, например в условиях стимуляции перекисного окисления липидов, следствием которого может быть солибилизация из микросом НАДФ-Н-зависимой редуктазы [3].

Известно, что ряд углеводов оказывает выраженное антиканцерогенное действие. Например, совместное введение полициклических углеводов хризена и бенз[a]пирена в соотношении 0,15 : 1 снижает количество сарком более чем на 70% [4]. Защитное действие оказывает также такое биологически важное соединение, как убихинон Q₁₀ [5]. В данной работе мы

попытались рассмотреть антиканцерогенное действие хризена и убихинона с единой точки зрения, а именно в плане нормализации ряда НАДФ·Н- и НАДФ·Н-зависимых окислительных реакций в клетке.

Методы исследования

В опытах использовали животных, не подвергавшихся воздействию канцерогена и после его однократного введения. Бенз[а]пирен вводили внутривенно крысам-самцам Вистар в дозе 1 мг на животное массой 120—150 г. Активность дегидрогеназ пентозофосфатного цикла оценивали по изменению оптической плотности при восстановлении НАДФ [6]. Скорость образования НАДФ·Н *in vivo* рассчитывали по формуле, предложенной Враттен и Клеланд [7], включающей наряду с константами Михаэлиса для НАДФ и субстрата константу ингибирования для продукта реакции — НАДФ·Н. Действие цитозольного фактора на перекисное окисление липидов микросом изучали, используя методику Талькота и соавт. [8]. Интенсивность перекисного окисления липидов оценивали по накоплению малонового диальдегида [9]. Качественный состав убихиноновой фракции печени крыс изучали путем разделения несмываемой фракции липидов печени на колонке с сефадексом LH-20 [10].

Результаты исследования

Гидроксирование бенз[а]пирена тесно связано с окислением глюкозо-6-фосфата по пентозофосфатному пути. Учитывая многообразие факторов, влияющих на активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, можно предположить, что при определенных условиях возможна ситуация, когда пентозофосфатный цикл не обеспечивает НАДФ·Н-зависимые реакции, локализованные в микросомах и растворимой фракции, необходимым количеством НАДФ·Н. Для выяснения этого вопроса важно сопоставить активность индуцированной гидроксилазной системы и эффективность использования ею НАДФ·Н с активностью системы, генерирующей НАДФ·Н, а также оценить действие факторов, изменяющих соотношение активностей этих систем. Вполне возможно, что ослабляющее канцерогенез действие хризена связано с изменением активности ферментов, участвующих в инактивации канцерогена.

В связи с этим мы определяли активность дегидрогеназ пентозофосфатного цикла в печени одновременно с выявлением гидроксилазной активности при введении животным бенз[а]пирена, а также при введении бенз[а]пирена вместе с хризенем в соотношении 1 : 0,15. Суммарная активность дегидрогеназ пентозофосфатного цикла на 2—3-и сутки после введения в первом случае повышалась в среднем в 2 раза, а во втором — в 2,7 раза. Максимальное же увеличение скорости метаболизма бенз[а]пирена гомогенатом в обоих случаях было практически одинаковым. Расчет показывает, что при физиологической концентрации глюкозо-6-фосфата скорость образования НАДФ·Н увеличивается при введении бенз[а]пирена в 3—4 раза, а при его введении вместе с хризенем — в 5—6 раз. Такой расчет справедлив при отношении НАДФ/НАДФ·Н более 0,1, так как при НАДФ/НАДФ·Н, равном 0,1 и меньше, активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в растворимой фракции тормозится на 95—100% [11]. В проведенном нами расчете значение НАДФ/НАДФ·Н и его изменение в зависимости от активности глутатионредуктазной реакции оценивались приближенно. Тем не менее из полученных данных следует, что при введении бенз[а]пирена вместе с хризенем активность системы, генерирующей НАДФ·Н, увеличивается в большей степени, чем при введении одного бенз[а]пирена.

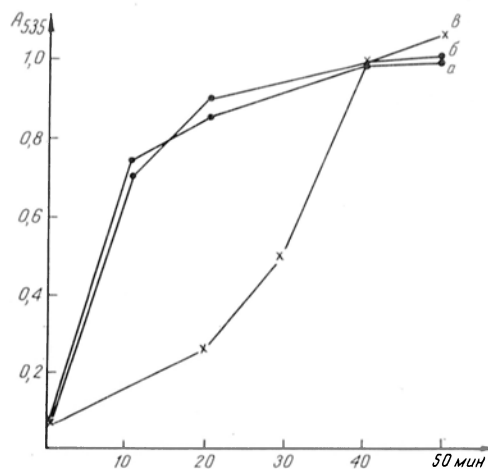
Одним из защитных механизмов, препятствующих накоплению продуктов перекисного окисления липидов, является ферментная система, включающая глутатионредуктазу и глутатионпероксидазу [12]. Вполне возможно, что относительный избыток НАДФ·Н используется для обеспечения функционирования этой системы, т. е. превращения гидроперекисей в оксипроизводные жирных кислот, что должно способствовать сохранению активности НАДФ·Н-зависимой редуктазы в микросомах, препятствуя созданию условий для ее солиubilизации. Эффективность функционирования этой

системы в активной фазе метаболизма бенз[а]пирена может быть оценена по ингибированию перекисного окисления липидов микросом при инкубации микросомальной фракции с цитозолем. В связи с этим мы изучали действие цитозольного фактора, сравнивая данные, полученные при использовании печени животных после введения одного бенз[а]пирена и вместе с хризеном (рис. 1). Как видно на рис. 1, добавление к микросомам цитозоля, полученного из печени животных после введения бенз[а]пирена вместе с хризеном, приводит к заметному ингибированию перекисного окисления липидов.

Гидроксилирование бенз[а]пирена может проходить и в ус-

Рис. 1. Действие цитозоля на перекисное окисление липидов микросом.

Микросомы контрольных животных (0,5 мг белка в 1 мл) инкубировали в 0,025 М трис-1,15% KCl-буфере, pH 7,5, содержащем 1 мМ НАДФ, 1 ед/мл глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, 6,6 мМ глюкозо-6-фосфата; а — без цитозоля, б — с цитозолем (2 мг белка в 1 мл), полученным после введения бенз[а]пирена, в — с цитозолем, полученным после введения бенз[а]пирена вместе с хризеном



ловиях пониженной активности НАДФ·Н-зависимой редуктазы. Снижение активности НАДФ·Н-зависимой редуктазы *in vivo*, по-видимому, не уменьшает интенсивности гидроксилирования бенз[а]пирена; гидроксилирование канцерогена поддерживается за счет перераспределения восстановительных эквивалентов между оксигеназной и оксидазной системой клетки. В гидроксилировании бенз[а]пирена в этом случае наряду с НАДФ·Н, по всей вероятности, принимают участие восстановительные эквиваленты митохондрий в форме НАД·Н. В пользу существования функциональной связи между гидроксилированием бенз[а]пирена и окислительными реакциями в митохондриях свидетельствуют данные об изменении в период метаболизма бенз[а]пирена энергетического состояния митохондрий [2].

Снижение активности окисления НАД-зависимых субстратов в митохондриях печени может быть обусловлено рядом факторов, в частности изменением содержания или акцепторных свойств убихинона. По данным Сторей и Чанса [13], именно восстановление убихинона является лимитирующей реакцией переноса электронов в дыхательной цепи. Значение убихинона подчеркивают данные, которые показывают, что развитие канцерогенеза зависит от начального уровня убихинона [5].

Кроме основных гомологов Q_{10} и Q_9 в печени крыс обнаружены в небольшом количестве (5—8%) гомологи Q_8 и Q_7 [14]. Нами был изучен качественный состав убихиноновой фракции печени крыс путем разделения компонентов неопыляемой фракции липидов по молекулярной массе. С помощью свидетелей — убихинонов Q_{10} (объем выхода 21 мл), Q_6 (24 мл) и Q_7 (23,2 мл) была построена зависимость объема выхода на колонке от молекулярной массы, позволяющая оценить молекулярную массу той или иной фракции. Как видно на рис. 2, хроматограммы липидов контрольных животных и животных после однократного введения бенз[а]пирена отличаются между собой профилем фракции I. Мы условно разделили фракцию I хроматограммы, полученной из неопыляемых липидов печени животных на 3-и сутки после введения бенз[а]пирена, на две подфракции: Ia и Ib. При восстановлении подфракций Ia и Ib боргидридом натрия наблюдался сдвиг максимума поглощения (275—290 нм), характерный для убихинон-убихинола. Фракция II с объемом выхода 25 мл окончательно не иденти-

фицирована, но, вероятно, в эту фракцию входит токоферилхинон, а фракция III включает токоферол [10].

Если исходить из того, что входящие в состав фракции I подфракции Ia и Ib содержат гомологи убихинона с разной длиной изопреноидной цепи, то из полученных данных следует, что в период метаболизма бенз[а]пирена

происходит нарушение биосинтеза кофермента Q. Следует отметить, что содержание кофермента Q практически не изменяется, но проис-

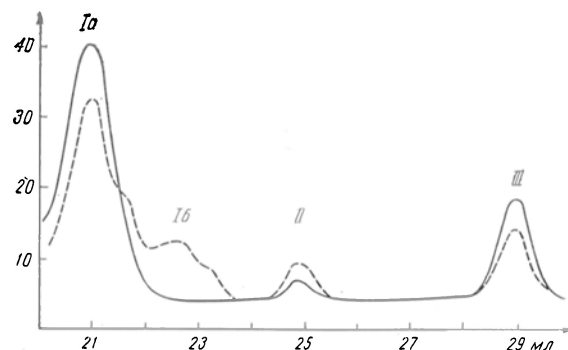


Рис. 2. Хроматограмма неомыляемой фракции липидов печени крыс.

По оси абсцисс — объем выхода (в мл); по оси ординат — процент поглощения. Сплошная линия — контроль; пунктирная — на 3-и сутки после введения бенз[а]пирена. Римские цифры — фракции.

ходит изменение состава убихиноновой фракции. Гомологи с более короткой изопреноидной цепью (Q_8 и Q_7) составляют около $1/5$ от общего содержания убихинонов. Гомологи убихинона имеют различную активность в НАД·Н-оксидазной системе. По данным Ленаца и соавт. [15], скорость окисления НАД·Н комплексом I зависит от длины изопреноидной цепи убихинона (например, активность Q_8 составляет около 80% от активности Q_{10}).

Обсуждение

Процесс гидроксирования тесно связан с окислением глюкозо-6-фосфата по пентозофосфатному пути. Образование глюкозо-6-фосфата в ходе первичного фосфорилирования глюкозы, т. е. связь между гексокиназной активностью и активностью дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата регулируется, как известно, центральной нервной системой. Регуляция такого типа отсутствует в тканях, утративших связь с центральной нервной системой — в злокачественных опухолях [16], и, возможно, ослаблена в печени животных, чувствительных к действию канцерогена.

При взаимодействии бенз[а]пирена с системой, осуществляющей его метаболизм, может складываться ситуация, когда энергетические потребности гидроксилазной системы оказываются довольно высокими, а транспорт электронов через НАДФ·Н-зависимый флавопротеид ограничен. Передача восстановительных эквивалентов из митохондрий в гидроксилазную систему через цепь НАД·Н — цитохром b_5 может обеспечить высокую эффективность инактивации канцерогена. Однако в конце активной фазы гидроксирования канцерогена такое перераспределение восстановительных эквивалентов не компенсирует снижение активности переноса электронов к кислороду в дыхательной цепи. При этом в митохондриях может быть расстроено существующее донорно-акцепторное равновесие.

Следствием снижения скорости окисления НАД·Н комплексом I может быть подключение активной системы свободного окисления флавинов — цитохром b_5 , локализованной во внешней мембране митохондрий к цитохром-оксидазе, в результате чего оказываются шунтированными первый и второй пункты энергетического сопряжения. Такое шунтирование связано с превращением энергии дыхания в тепло [17] и вполне возможно, что степень шунтирования определяется акцепторными свойствами убихинона. Иными словами, запасание энергии дыхания в форме АТФ или превращение ее в тепло, возможно, регулируется редокс-состоянием убихинона,

Одним из основных нарушений, возникающих вследствие метаболизма бенз[а]пирена, является изменение фосфатного потенциала митохондрий печени. Известно, что отношение НАД·Н/НАД в митохондриях печени и, следовательно, отношение β -оксibuтират/ацетоацетат могут регулироваться за счет энергозависимого восстановления НАД сукцинатом. Однако в условиях, когда первый и второй пункты сопряжения шунтированы системой НАД·Н — цитохром b_5 , такой тип регуляции, по-видимому, отсутствует, подобно тому, как это имеет место при шунтировании первого пункта менадионом [18]. Согласно Клингенбергер и Хефен [19], диффузия пары β -оксibuтират — ацетоацетат в кровотоки обеспечивает передачу состояния окисления — восстановления этих веществ и фосфатного потенциала митохондрий печени в митохондрии периферических органов.

Таким образом, если в клетках печени реализуется НАД·Н-зависимое гидроксилирование бенз[а]пирена, то оно осуществляется за счет нарушения основной функции НАД-связанной системы — окислительного фосфорилирования и это нарушение затрагивает, по-видимому, как печень, так и орган-мишень. Антиканцерогенное действие двух различных соединений хризена и убихинона можно рассматривать, на наш взгляд, как результат нормализации окислительных реакций в печени на стадии метаболизма канцерогена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kouri R., Salerno R., Whitmire C. — J. nat. Cancer Inst., 1973, v. 50, p. 363—368. — 2. Дмитриев Л. Ф., Иванов И. И. — Докл. АН СССР, 1977, т. 236, с. 471—473. — 3. Hogberg J., Larson R. E., Kristoferson A. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1974, v. 56, p. 836—842. — 4. Falk H. L., Kotin P., Thompson S. — Arch. environm. Hlth, 1964, v. 9, p. 169—179. — 5. Bliznakov E. G. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, p. 390—395. — 6. Glock G. E., McLean P. — Biochem. J., 1953, v. 55, p. 400—408. — 7. Wratten C. C., Cleland W. W. — Biochemistry (Wash.), 1963, v. 2, p. 935—941. — 8. Talcott R. E., Denk H., Esskerstorfer R. et al. — Chem. - Biol. Interact., 1976, v. 12, p. 355—361. — 9. Ottolenghi A. — Arch. Biochem., 1959, v. 79, p. 355—363. — 10. Мерзляк М. Н., Иванов И. И., Тарусов Б. Н. — Stud. Biophys., 1972, v. 30, p. 29—35. — 11. Eggleston L. V., Krebs H. A. — Biochem. J., 1974, v. 138, p. 425—435. — 12. Chow C. K., Tappel A. L. — Lipids, 1972, v. 7, p. 518—524. — 13. Storey N., Chance B. — Arch. Biochem., 1967, v. 121, p. 279—289. — 14. Diplock A. T., Edwin E. E., Green J. et al. — Nature, 1960, v. 186, p. 554—555. — 15. Lenaz G., Daves G., Folkers K. — Arch. Biochem., 1968, v. 123, p. 539—545. — 16. Weber G. — Advanc Enzyme Regulat., 1963, v. 1, p. 321—340. — 17. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972. — 18. Caraballo F., Bird J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1969, v. 34, p. 92—98. — 19. Klingenberg M., Hefen H. — Biochem. Z., 1963, Bd 337, S. 120—127.

Поступила 16/VIII 1978 г.

ON THE DISTRIBUTION OF REDUCING EQUIVALENTS IN CELL DURING THE ACTIVE PHASE OF BENZ/A/PYRENE METABOLISM

L. F. Dmitriev, I. I. Ivanov

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Hydroxylation of benz/a/pyrene might occur under decreased activity of NADPH-dependent reductase. In vivo a decrease in the activity of NADPH-dependent reductase did not influence apparently the intensity of benz/a/pyrene hydroxylation, which is maintained due to redistribution of reducing equivalents between oxygenase and oxidase systems in the cells. Anticarcinogenic effects of two different substances chrisene and ubiquinone are discussed taking into account possible normalization of NADPH- and NADH-dependent oxidative reactions in the cells.

Н. М. Мананкова, Э. А. Нестеренко, С. В. Аргутинская, Р. И. Салганик

ВЛИЯНИЕ РАННЕЙ ПОСТНАТАЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ МИКРОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ НА ИХ АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В КРОВИ ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКОЙ ЛИНИИ

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР, Новосибирск

В сыворотке крови мышей линии SWR/j содержание холестерина (ХС) и атерогенных фракций липопротеидов (ЛП) выше, чем у устойчивых к атеросклерозу мышей линии C57Bl/6j. В печени мышей линии SWR/j ниже активность ХС-7 α -гидроксилазы — ключевого фермента биотрансформации и элиминации ХС и выше скорость биосинтеза ХС. Введение таким мышам индуктора микросомальных ферментов — 3-ацетат-16 α -изотиоцианопрегненолона (АТЦП) в ранний постнатальный период приводит к значительному повышению активности арилгидрокарбонгидроксилазы, которое наблюдалось в течение всего изученного периода, к увеличению активности холестерин-7 α -гидроксилазы, которое сохраняется не менее 2 мес и к существенному снижению содержания ХС и атерогенных фракций ЛП. У животных, получавших АТЦП, и у контрольных мышей скорости синтеза ХС существенно не различались.

Известно, что ряд гормонов и экзогенных веществ индуцируют в чувствительных к ним клетках животных синтез адаптивных ферментов, реализующих физиологические функции этих гормонов или метаболизирующих экзогенные вещества. Индукция осуществляется в результате стимуляции ДНК-зависимого синтеза РНК, обеспечивающей синтез соответствующих ферментов [1—3].

Ранее было показано, что многократное введение животным таких генетических индукторов, как кортизол, инсулин, галактоза, пентагастрин, ведет к длительному подавлению способности клеток-мишеней реагировать на них синтезом РНК и отвечать возрастанием активности соответствующих индуцибельных ферментов [4—7]. У молодых животных толерантность к индукторам развивалась быстрее и сохранялась дольше, чем у взрослых. Можно было допустить, что введение индуктора животным в ранний постнатальный период оставит еще более длительный след в способности соответствующих клеток-мишеней к индукции. Недавно получены данные, подтверждающие это предположение. Оказалось, что введение кортизола крысам в течение первых 2 нед после рождения ведет к стабильно сохраняющемуся повышению активности тирозинаминотрансферазы у взрослых крыс; одновременно происходит почти полная утрата способности клеток печени реагировать индукцией этого фермента на введение кортизола [8].

Известно, что ряд гидрофобных чужеродных и эндогенных соединений являются индукторами микросомальных ферментов печени животных — оксидаз смешанных функций [9]. Индукция микросомальных ферментов представляет значительный практический интерес, поскольку позволяет усиливать выведение холестерина (ХС), билирубина, ряда лекарственных веществ при избыточном их накоплении в организме [10].

Ранее среди химически модифицированных фитостероидов были обнаружены высокоэффективные индукторы микросомальных ферментов, не обладающие иными фармакологическими свойствами [11]; особо эффективным индуктором оказался 3-ацетат-16 α -изотиоцианопрегненолон (АТЦП). Было показано, что индукция микросомальных ферментов под действием АТЦП обеспечивает снижение содержания ХС в крови животных при алиментарной и наследственной формах гиперхолестеринемии [12, 13].

В настоящей работе исследовано влияние введения АТЦП мышам в ранний постнатальный период на активность микросомальных ферментов у взрослых животных. Изучено влияние такого воздействия на показатели

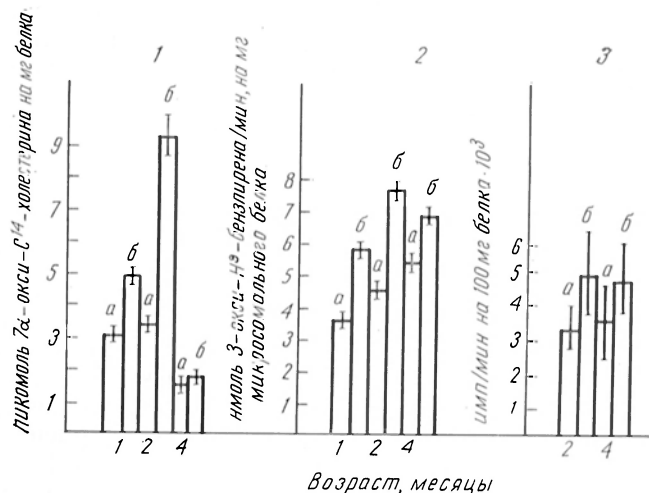
метаболизма ХС у мышей линии SWR/j с наследственной гиперхолестеринемией.

Методика

В работе использовали новорожденных мышей линии SWR/j, характеризующейся спонтанным развитием атеросклероза [14]. В сыворотке крови мышей линии SWR/j содержание ХС и атерогенных фракций липопротеидов (ЛП) выше, чем у устойчивых к атеросклерозу мышей линии C57B1/6j. В печени мышей линии SWR/j ниже активность ХС-7 α -гидроксилазы, ключевого фермента биотрансформации и элиминации ХС, и выше скорость биосинтеза ХС [13]. Для изучения влияния постнатального введения индуктора микросомальных ферментов новорожденным мышам линии

Влияние раннего постнатального введения АТЦП на активность ХС-7 α -гидроксилазы (1), арилгидрокарбонгидроксилазы (2), скорость биосинтеза ХС (3) в печени взрослых мышей линии SWR/j.

Новорожденным мышатам, начиная со 2-го дня после рождения, в течение 14 дней вводили per os АТЦП по 0,2 мг в день в течение первых 7 дней и по 0,4 мг в день в последующие. Определение активности ферментов проводили спустя 1, 2 и 4 мес после рождения; а — контроль; б — введение АТЦП.



SWR/j вводили суспензию АТЦП начиная со 2-го дня и в течение последующих 14 дней. Доза индуктора составляла 0,2 мг АТЦП в день на новорожденного мышонка в течение первых 7 дней введения и 0,4 мг в день на животное в последующие 7 дней. Забой животных проводили спустя 1, 2 и 4 мес после рождения. Препарат АТЦП готовили следующим образом: 87,5 мг АТЦП смешивали с 10 мл дистиллированной воды и добавляли 1 каплю твина-80. Для получения более тонкой суспензии препарат подвергали обработке ультразвуком. Контрольным животным в равном объеме вводили растворитель АТЦП.

ХС сыворотки крови определяли спектрофотометрически при 570 нм, пользуясь микрометодом Кларка и соавт. [15]. В качестве стандарта использовали готовый раствор ХС (100 мг%) в хлороформе. Концентрацию ХС в сыворотке крови выражали в миллиграммах на 100 мл сыворотки (мг%).

Разделение ЛП сыворотки крови осуществляли по методу Маграчевой [16] путем диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Сыворотку предварительно окрашивали раствором судана черного В в этиленгликоле в течение 1½ ч в темноте. Электрофорез вели в приборе «Reanal», Венгрия. Время электрофореза составляло 1½—2 ч при силе тока 3—4 мА на трубку. После окончания разделения ЛП на фракции гель в трубках сканировали на денситометре. По площади отдельных пиков судили о количественном содержании каждой фракции ЛП и выражали их содержание в процентах по отношению к общей площади.

Активность ХС-7 α -гидроксилазы в печени определяли описанным методом и выражали в пикомолях образовавшегося 7 α -оксн-4-¹⁴С-ХС из 4-С¹⁴-ХС на 1 мг белка за 40 мин инкубации [13]. Количество белка в пробах определяли по методу Лоури и соавт. [17].

Скорость биосинтеза ХС в печени определяли по описанному методу и выражали в имп/мин включенного 1-¹⁴С-ацетата во фракцию ХС на 100 мг белка [13]. Активность микросомального фермента арилгидроксилазы [бенз(а)пиренгидроксилазы] определяли модифицированным нами методом. Инкубационная среда содержала в общем объеме 1 мл: 0,5 мг микросомального белка; 1 мМ НАДФ⁺, 6 мМ изоцитрата; 0,36 ЕА изоцитратдегидрогеназы; 5 мМ MgCl₂; 50 мМ трис-НСl рН 7,5; 5 мкМ MnCl₂; 80 мкМ ³H-бенз(а)пирена в 0,025 мл ацетона (удельная активность 12 мкКи/мкмоль) [18]. Инкубацию проводили на воздухе при 37°C в течение 30 мин. Остановку реакции и выделение образовавшихся продуктов окисления ³H-бензпирена осуществляли по описанному методу [19]. Активность арилгидроксилазы выражали в панолях образовавшихся продуктов на 1 мг микросомального белка за 1 мин инкубации.

Влияние раннего постнатального введения АТЦП на содержание ХС и фракций ЛП в сыворотке крови взрослых мышей линии SWR/j

Возраст животных, мес	Условия опыта	Содержание ХС, 1 мг на 100 мл сыворотки	Содержание фракций ЛП, %			
			ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП	альбумины + НЭЖК
1	Контроль Опыт: АТЦП	101,7±5,8 (18) 61,01±3,94 (16)	5,20±0,15 (14) 3,71±0,33 (12)	20,19±2,13 (14) 10,30±1,11	63,37±3,00 77,10±2,30	10,10±2,00 10,35±1,71
2	Контроль Опыт: АТЦП	152,48±10,94 (10) 102,93±8,78 (19)	5,17±0,18 (15) 3,39±0,41 (10)	27,80±1,90 15,71±1,10	56,72±1,89 71,50±3,00	12,13±1,17 10,53±1,39
4	Контроль Опыт: АТЦП	138,08±12,60 (17) 134,58±7,21 (11)	6,17±0,13 (15) 4,91±0,33 (13)	30,55±3,83 18,30±2,53	52,00±1,81 67,30±2,15	12,40±1,18 11,36±1,12

Примечание. ЛПОНП — липопротеиды очень низкой плотности; ЛПНП — липопротеиды низкой плотности; ЛПВП — липопротеиды высокой плотности; НЭЖК — незатерифицированные жирные кислоты. Условия опыта описаны в пединси под рисунком. В скобках — число животных в опыте.

Результаты и их обсуждение

Как видно из данных, представленных на рисунке, введение новорожденным мышатам индуктора микросомальных ферментов АТЦП в первые 14 дней после рождения ведет к значительному повышению активности арилгидроксилазы, которое наблюдалось по крайней мере на протяжении 4 мес, в течение которых велось наблюдение. Результатом такого постнатального воздействия является также увеличение активности ХС-7 α -гидроксилазы, которое сохраняется не менее 2 мес.

Таким образом, под действием АТЦП возникает следовой эффект, выражающийся в длительном и стабильном повышении активности индуцируемых им ферментов. Ранее было показано, что постнатальное введение кортизола в течение 14 дней ведет к длительному повышению активности индуцируемого этим гормоном фермента — тирозинаминотрансферазы [18].

Полученные данные позволяют предположить, что интенсивная генетическая индукция в ранний постнатальный период, когда продолжается еще дифференцировка многих систем клеток, ведет к стабильным изменениям в экспрессии генов, на которые воздействуют эти индукторы. Эти изменения напоминают явления, происходящие при иммунизации в ранний постнатальный период, когда определенные антигены вызывают стабильную иммунологическую толерантность к ним. Аналогично этому предъявление зрительного образа в этот критический период ведет к длительному запечатлеванию его — к импринтингу [20].

Возможно, что все эти явления имеют общую природу и связаны с особой чувствительностью генетического аппарата к индукции в связи с еще незавершившейся его дифференцировкой.

Известно, что ферменты микросом печени способны гидроксилировать ХС, обеспечивая тем самым его превращение в желчные кислоты и выведение из организма. Оказалось, что длительная индукция этих фер-

ментов, вызванная постнатальным введением АТЦП, ведет к существенному снижению содержания ХС в крови мышей линии SWR/j, характеризующихся наследственной гиперхолестеринемией (см. таблицу).

Как видно из таблицы, у животных, получавших постнатально АТЦП, резко снижено в течение 2 мес после рождения не только содержание ХС в крови, но и содержание фракций атерогенных ЛП низкой плотности, играющих определяющую роль в развитии атеросклероза.

Скорость биосинтеза ХС у животных, получавших АТЦП, и контрольных мышей достоверно не различалась.

Имеются данные, подтверждающие возможность активации ферментов метаболизма чужеродных веществ при постнатальном введении их индукторов. Так, если новорожденным кроликам вводили однократно инсектицид хлордан, то способность интенсивно метаболизировать гексобарбитал сохранялась у них на протяжении 1 мес.

Не исключено, что описанный нами импринтинг ферментов, элиминирующих ХС под влиянием раннего постнатального введения индукторов этих ферментов, может стать одним из приемов предупреждения гиперхолестеринемии, например при наследственной ее форме — семейной гиперхолестеринемии, которая может быть диагностирована при рождении или даже пренатально.

ЛИТЕРАТУРА

1. Williams-Ashman H. G. — *Cancer Res.*, 1965, v. 25, p. 1096—1120.
2. Салганик Р. И. — *Вестн. АМН СССР*, 1968, № 8, с. 3—11.
3. Pittot H. C., Jatwin W. B. — *Physiol. Rev.*, 1973, v. 53, p. 228—325.
4. Салганик Р. И., Аргутинская С. В., Мертвецов Н. П. и др. — *Молекулярная биол.*, 1968, № 2, с. 721—726.
5. Salganik R. I., Mervetsov N. P. et al. — *Acta endocr. (Kbh.)*, 1974, v. 76, p. 319—331.
6. Салганик Р. И., Соловьева Н. А. — *Вопр. мед. химии*, 1972, № 5, с. 472—477.
7. Салганик Р. И., Аргутинская С. В., Берсимбаев Р. И. и др. — *Там же*, № 4, с. 390—393.
8. Салганик Р. И., Маркель А. Л., Багинская Н. И. и др. — *Онтогенез*, 1978, № 9, с. 193—197.
9. Conney A., Davison S. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1960, v. 130, p. 1—18.
10. Breskenridge A. — *Basic Life Sci.*, 1975, 6, p. 273—318.
11. Неделькина С. В. Роль индукции и торможения микросомальных ферментов печени крыс в превращениях чужеродных и эндогенных соединений. Дис. канд. Новосибирск, 1974.
12. Салганик Р. И., Мананкова Н. М., Семенова Л. А. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 4, с. 468—473.
13. Мананкова Н. М., Швецов С. В., Аргутинская С. В. и др. — *Биохимия*, 1978, т. 43, № 7, с. 1233—1241.
14. Russell E. S., Meier H. — In: *Biology of Laboratory Mouse*, Ed. E. L. Green. New York, 1966, p. 571—589.
15. Clark B. R., Rubin R. T., Arthur R. J. — *Analyt. Biochem.*, 1968, v. 24, p. 27—32.
16. Маграчева Е. Я. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 6, с. 652—655.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr A. I. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265.
18. De Pierre J. W., Moron J. S., Johannessen K. A. et al. — *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 63, p. 470—484.
19. Van Cantfort J., de Grave J., Gielen J. E. — In: *International Conference on in Vivo Aspects of Biotransformation and Toxicity of Industrial and Environmental Xenobiotics. Abstracts Prague*, 1977, p. 15.
20. Fouts J. R., Hart L. J. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1965, v. 123, p. 245—250.

Поступила 21/VIII 1978 г.

EFFECT OF EARLY POSTNATAL INDUCTION OF MICROSOMAL ENZYMES ON THEIR ACTIVITY AND CONTENT OF CHOLESTEROL IN BLOOD OF AGED MICE OF STRAIN SWR/y WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA

N. M. Manankova, E. A. Nesterenko, S. V. Argutinskaya, R. I. Salganik

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Academy of Sciences of the USSR,
Novosibirsk

Activity of microsomal enzymes and the patterns of cholesterol metabolism were studied in mice of SWR/y strain, characterized by spontaneous development of atherosclerosis within the later periods of life, after early postnatal administration of an inducer of the enzymes 3-acetate-16 α -isothiocyano-pregnenolone (ATCP). Administration of ATCP into newborn mice of SWR/y strain, from the 2nd up to 16th day after birth,

led to a stable increase in activity of arylhydrocarbonate hydroxylase (an enzyme participating in unspecific metabolism of drugs), which was observed during the whole experimental period (4 months). The treatment with ATCP caused also a distinct increase in activity of cholesterol-7 α -hydroxylase (a key enzyme of cholesterol biotransformation and elimination) as well as a considerable decrease in content of cholesterol and lipoprotein atherogenic fractions in blood serum. The rate of cholesterol biosynthesis was similar both in mice treated with ATCP and in the control animals.

УДК 616.825.54.015.11.014.44

Э. Кунерт, Е. Л. Доведова

ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА ОБМЕН ГАМК В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КРОЛИКОВ

Лаборатория нейрохимии Института мозга Университета им. К. Маркса, Лейпциг,
ГДР, лаборатория биогистохимии Института мозга АМН СССР, Москва

В субфракциях синапсом и митохондрий зрительной области коры больших полушарий и переднего двухолмия мозга кроликов исследовали активность ферментов обмена ГАМК — глутаматдекарбоксилазы (ГДК) и ГАМК-аминотрансферазы (ГАМК-т) в норме и в условиях световой депривации (содержание животных в темноте в течение 10 нед с момента рождения). Для сравнения исследовали двигательную область коры больших полушарий контрольных и подопытных кроликов. Показано статистически достоверное снижение удельной активности ГДК в субфракциях легких и тяжелых синапсом, а ГАМК-т — во всех субфракциях обоих образований зрительной системы, но не двигательной области коры. Уменьшение отношения ГАМК-т/ГДК в эксперименте отражает более выраженное торможение распада ГАМК по сравнению с ее синтезом в условиях отсутствия специфической импульсации.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что световая депривация оказывает специфическое влияние на ферменты обмена ГАМК в субклеточных структурах зрительной системы мозга кроликов.

В многочисленных морфологических, электрофизиологических и биохимических исследованиях показано влияние световой депривации на зрительную систему различных млекопитающих [1—4]. В лаборатории биогистохимии Института мозга АМН СССР были показаны морфобиохимические перестройки нейронов зрительной области коры и переключательных образований при выдерживании животных в темноте с момента рождения. При этом обнаружены изменения нервной проводимости и ионного транспорта через синаптические мембраны, а также нарушение окислительных процессов в митохондриях мозга [5, 6]. Эти изменения специфичны для отдельных циклов обмена и обратимы во времени.

Полученные ранее данные свидетельствуют о том, что эффект световой депривации сложен и механизмы этого влияния еще полностью не раскрыты. Роль ГАМК как тормозного медиатора в центральной нервной системе млекопитающих хорошо известна [7—9].

В настоящей работе исследовали ферменты обмена ГАМК — декарбоксилазы L-глутаминовой кислоты (ГДК) и ГАМК-аминотрансферазы (ГАМК-т) во фракциях синапсом и митохондрий из образований зрительной системы кроликов в норме и в условиях световой депривации.

Методы

Использован мозг 9 контрольных и 9 подопытных кроликов. Из мозга выделяли зрительную область коры больших полушарий и переключательные звенья зрительной системы: наружные коленчатые тела (НКТ) и переднее двухолмие. Для сравнения брали двигательную область коры мозга животных. Подопытных животных в течение 10 нед с момента рождения содержали в темной камере, контрольные кролики развивались в условиях нормального светового режима и были взяты в опыт в возрасте 2½—3 мес.

Методом дифференциального центрифугирования на VAC-601 (11 500× g, 20 мин) из тканей этих образований изолировали исходные фракции митохондрий (М). Суспензию митохондрий из коры больших полушарий и переднего двухолмия

наслаивали на градиент сахарозы (0,8—1,4 М) и выделяли субфракции синаптических мембран (В), легких (С) и тяжелых (Д) синапсом и свободных митохондрий (Е) по Де Робертису и соавт. [10] в некоторой модификации (120 000 × g, 45 мин). Повторное центрифугирование проводили при 100 000 × g 30 мин. В полученных субфракциях определяли активность ГДК и ГАМК-т, а также содержание белка по Лоури [11] в микромодификации при 750 нм, объем пробы составлял 20 мкл, содержание белка в пробе — 1—2,5 мкг.

Активность ГДК определяли с помощью флуориметрического метода Лоу и соавт. [12] в нашей микромодификации: 50 мкл реакционной смеси и 50 мкл суспензии каждой субфракции, содержащей от 20 до 50 мкг белка и 0,5% тритона X-100 (конечная концентрация), инкубировали в течение 1 ч при 38°C. Реакционную смесь готовили непосредственно перед инкубацией; ее состав: 1 мл 0,4 М калий-фосфатного буфера, рН 6,4; 0,5 мл 4,0 мМ пиридоксальфосфата; 0,5 0,2 М глутамата калия, рН 6,4.

Т а б л и ц а 1

Удельная активность ГАМК-т в субклеточных фракциях образований зрительной системы и двигательной области коры кроликов (в мкмоль НАДФ/ч на 1 г белка)

Область мозга	Фракция	Контроль	Депривация	P
Двигательная кора	М	661±35	515±157	>0,1
	В	624±65	514±282	>0,1
	С	539±32	440±47	<0,05
	Д	1030±270	664±187	>0,1
	Е	2080±326	1410±940	>0,1
Зрительная кора	М	594±45	328±47	<0,005
	В	811±132	363±185	<0,05
	С	671±97	301±70	<0,01
	Д	1310±332	406±67	<0,01
	Е	2150±427	1410±55	<0,05
Переднее двухолмие	М	970±96	427±157	<0,01
	В	932±47	386±74	<0,001
	С	1090±234	361±82	<0,001
	Д	2420±313	796±268	<0,005
	Е	3540±771	1360±530	<0,02
Наружные коленчатые тела	М	468±170	205±131	>0,1

Инкубацию останавливали добавлением 0,1 мл трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования при 10 000 об/мин в течение 5 мин 0,1 мл центрифугата смешивали с 0,2 мл раствора ингидрина, приготовленного непосредственно перед определением, и помещали на 30 мин в термостат (60°C), добавляли 6 мл медного реактива по Лоу [12] и через 15 мин измеряли флуоресценцию раствора в спектрофотометре MPF-4 (фирма «Хитахи») при длине волны возбуждения и флуоресценции соответственно 375 и 450 нм. Реакция была линейной в течение 30—60 мин инкубации. Triton X-100 повышал активность ГДК в 7 раз. Калибровочная кривая была построена при добавлении в среду до инкубации различных количеств ГАМК (от 1,5 до 100 мМ).

Активность ГАМК-т измеряли, используя микромодификацию метода Балаш и соавт. [13] в сочетании с методом Лоури для определения НАДФ [14]. Принцип метода состоит в комбинации обратимой реакции, катализируемой ГАМК-т, с реакцией окислительного аминирования α-кетоглутарата, катализируемой глутаматдегидрогеназой, с образованием глутамата. Образованный в реакции НАДФ определяли спектрофлуориметрически. Объем инкубационных проб составлял 0,1 мл, реакцию останавливали 0,1 мл HCl. Затем добавляли 0,2 мл 12 н. NaOH, содержащего 0,03% H₂O₂, и щелочной раствор инкубировали в течение 20 мин при 60°C. Раствор разводили 2 мл H₂O и измеряли флуоресценцию щелочного производного НАДФ при 455 нм (возбуждающий свет 365 нм). Для построения стандартной кривой в среду добавляли НАДФ в концентрации от 0,5 до 5,0 мМ и реакцию останавливали до инкубации.

Ферментативную активность выражали в влажной ткани или на 1 г белка (удельная активность) соответствующей субфракции. Изменения ферментативной активности в результате депривации выражали в процентах к контролю, который принимали за 100. Цифровой материал обработан статистически.

Результаты и обсуждение

В норме во всех субклеточных фракциях различных образований мозга ферменты обмена ГАМК показали типичное распределение активности. Так, максимум удельной активности ГАМК-т был обнаружен в субфракции Е, содержащей свободные митохондрии тел и отростков нервных клеток (табл. 1). Основная удельная активность ГДК была сосредоточена в субфракциях С и D (табл. 2). Различий в содержании белка в субфракциях между контрольными и лишенными света животными не наблюдалось, за исключением небольшого (около 20%) снижения уровня белка в субфракции Е после депривации ($0,1 < P > 0,05$).

Таблица 2

Удельная активность ГДК в субклеточных фракциях образований зрительной системы и двигательной области коры кроликов (в мкмоль ГАМК/ч на 1 г белка)

Область мозга	Фракция	Контроль	Депривация	P
Двигательная кора	М	78±16	67±14	>0,1
	В	96±24	92±7	>0,1
	С	106±21	103±13	>0,1
	D	130±14	83±26	>0,05
	Е	100±98	25±20	>0,1
Зрительная кора	М	77±13	53±16	>0,1
	В	70±14	84±17	>0,1
	С	176±31	70±17	<0,05
	D	177±24	88±18	<0,01
	Е	124±63	48±24	>0,1
Переднее двухолмие	М	141±22	119±29	>0,1
	В	210±7	142±14	<0,005
	С	319±39	241±20	<0,05
	D	351±130	147±27	>0,05
	Е	227±55	98±27	<0,025
Наружные коленчатые тела	М	34±14	35±8	>0,1

В условиях световой депривации обнаружено снижение удельной активности ГДК во всех исследуемых субфракциях зрительной системы мозга. При сравнении различных типов синапсов, где локализуется основная активность фермента, можно отметить, что в переднем двухолмьи подавление активности ГДК более выражено в субфракции D, чем в субфракции С. В обеих этих субфракциях зрительной области коры указанные изменения одинаковы (рис. 1). Удельная активность ГАМК-т в образованиях зрительной системы также значительно подавляется. Все субфракции зрительной области коры демонстрируют статистически достоверное снижение активности фермента после зрительной депривации. При сравнении изменений ферментативной активности в синаптических и клеточных митохондриях выявляется одинаковое снижение активности ГАМК-т во всех субфракциях переднего двухолмия и более заметное падение ферментативной активности в субфракциях С и D по сравнению с субфракцией Е зрительной области коры (рис. 2).

В субфракциях двигательной области коры лишенных света кроликов не обнаружено статистически достоверных изменений удельной активности ГДК по сравнению с контролем. В этой области мозга не наблюдается и заметных изменений удельной активности ГАМК-т, за исключением субфракции С.

В исходных фракциях митохондрий всех исследуемых образований мозга статистически достоверных изменений удельной активности ГДК при исключении зрительной импульсации не обнаружено; в отношении ГАМК-т наблюдается выраженное снижение ферментативной активности в митохондриальных фракциях образований зрительной системы, однако в НКТ

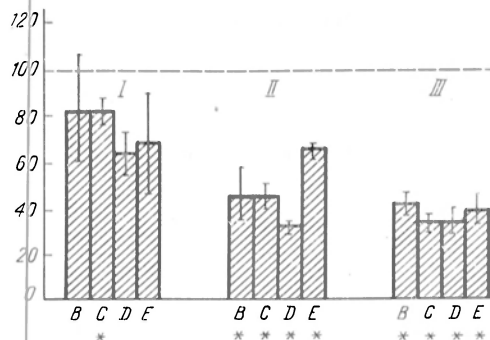


Рис. 1. Изменение удельной активности глутаматдекарбоксилазы (в % от контроля) в субфракциях двигательной (I), зрительной (II) областей коры и переднего двухолмия (III) мозга лишенных света кроликов.

В — синаптические мембраны; С — легкие синапсомы; D — тяжелые синапсомы; E — свободные митохондрии. Звездочками отмечены статистически достоверные изменения по сравнению с контролем.

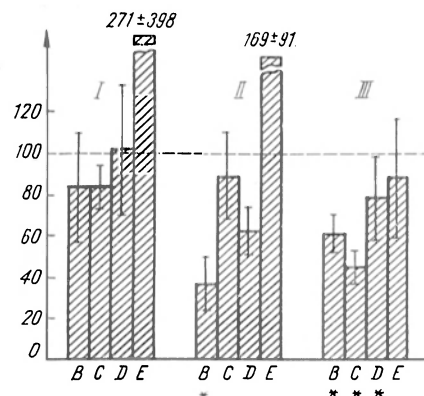


Рис. 2. Изменение удельной активности ГАМК-т (в % от контроля) в субфракциях двигательной (I), зрительной (II), областей коры и переднего двухолмия (III) мозга лишенных света кроликов. Здесь и на рис. 3 обозначения те же, что на рис. 1.

эти изменения недостоверны (см. табл. 1, 2). В условиях световой депривации обнаружено снижение отношения удельной активности ГАМК-т/ГДК в исходной фракции M и субфракциях В и С переднего двухолмия. Такая же тенденция наблюдалась и в субфракциях В и D зрительной области, но не двигательной области коры больших полушарий (табл. 3; рис. 3).

Полученные результаты дают основание считать, что ГАМК играет важную роль в зрительной функции. Имеются данные, что в геникуло-кортикальных релейных нейронах НКТ мозга кошек депрессивное действие ГАМК избирательно блокируется ее антагонистом бикукулином в концентрациях неэффективных, в частности для глицина. С другой стороны, подавление этих нейронов при стимуляции зрительной области коры и зрительного нерва также блокируется бикукулином [15].

Имеются данные о роли ГАМК как тормозного медиатора в коре больших полушарий мозга крыс. В частности, ГАМК активно накапливается в синапсоммах, содержащих ГДК [16, 17]. Сочетание автордиографического и электронно-микроскопического методов показало, что около 30% синапсомом коры больших полушарий мозга крыс может рассматриваться как синапсы, содержащие ГАМК [18]. Относительно высока активность ГДК, выявленная в переднем двухолмии крыс. Согласуется с этим фактом

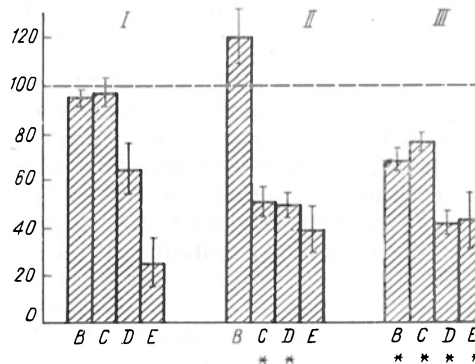


Рис. 3. Изменение отношения ГАМК-т/ГДК (в % от контроля) в субфракциях двигательной (I), зрительной (II) областей коры и переднего двухолмия (III) мозга лишенных света кроликов.

и высокое содержание ГАМК в переднем двухолмии крыс и кроликов [19].

Окада [20] нашел, что содержание ГАМК не изменяется при перерезке афферентных нервов из зрительной коры, сетчатки и контралатерального переднего двухолмия. Поэтому ГАМК-нейроны в поверхностном слое переднего двухолмия можно рассматривать как интернейроны. Все полученные данные косвенно свидетельствуют о том, что ГАМК как тормозной медиатор, по-видимому, может участвовать в процессе зрительного восприятия.

Т а б л и ц а 3

Отношение удельной активности ГАМК-т и ГДК в субклеточных фракциях образований зрительной системы и двигательной области коры кроликов

Область мозга	Фракция	Контроль	Депривация	P
Двигательная кора	М	8,5±2,2	7,7±3,9	>0,1
	В	6,5±2,3	5,6±3,5	>0,1
	С	5,1±1,3	4,3±1,0	>0,1
	Д	7,9±2,9	8,0±4,8	>0,1
	Е	20,8±23,6	56,3±82,6	>0,1
Зрительная кора	М	7,7±1,9	6,2±2,8	>0,1
	В	11,6±4,2	4,3±3,0	>0,05
	С	4,9±1,8	4,3±2,0	>0,1
	Д	7,4±2,9	4,6±1,7	>0,1
	Е	17,3±12,3	29,3±15,8	>0,1
Переднее двухолмие	М	6,9±1,8	3,6±2,2	<0,02
	В	4,4±0,4	2,7±0,8	<0,05
	С	3,4±1,2	1,5±0,5	>0,05
	Д	6,9±3,4	5,4±2,8	>0,1
	Е	15,6±7,2	13,8±9,2	>0,1
Наружные коленчатые тела	М	13,8±10,7	5,8±5,1	>0,1

При исследовании ультраструктуры коры у лишенных света кроликов не обнаружено изменения количества нейронов, однако в нервных окончаниях показано значительное уменьшение числа синаптических пузырьков. Описанный эффект сохраняется в течение длительного времени. Это явление наблюдалось в зрительной, но не в двигательной области коры [2, 4].

В то время как для НКТ также показано снижение количества синапсов после световой депривации, в переднем двухолмии обнаружены лишь незначительные структурные изменения [21]. С помощью количественных гистохимических методов показано, что длительное содержание животных в темноте с момента рождения приводит во всех образованиях зрительной системы к морфохимическому недоразвитию нейронов, особенно тех, которые рассматриваются как специфически зрительные (в коре больших полушарий нейроны 4-го слоя 17-го поля). Такое недоразвитие проявляется в уменьшении содержания мембранных белков с одновременным уменьшением размеров тел нейронов [22]. На субклеточном уровне наблюдается значительное подавление K^+ , Na^+ -АТФазы и нарушение обмена нейромедиаторов, что выражается в снижении активности ацетилхолинэстеразы и уменьшении связывания серотонина с синаптическими рецепторами и приводит, по-видимому, к накоплению медиатора в области синапса. Одновременно регистрируется повышение активности моноаминоксидазы в синаптических митохондриях, что, возможно, является компенсаторным процессом для поддержания уровня биогенных аминов в условиях зрительной деафферентации [23].

Данные, представленные в этой работе, показали, что в субфракциях клеток зрительных центров снижается активность ГДК и ГАМК-т, что,

по-видимому, отражает усиление тормозного состояния части нейронов данных образований мозга в условиях световой депривации и не наблюдается в двигательной области коры кроликов.

Во всех случаях активность ГДК в исходной митохондриальной фракции (М) зрительной области коры больших полушарий и переднего двухолмия у лишенных света кроликов ниже, чем у контрольных животных, однако разброс величин так значителен, что статистически достоверных изменений не обнаружено.

В НКТ не обнаружено изменений активности ГДК по сравнению с контролем.

Сравнение изменений активности ГДК и ГАМК-т в условиях эксперимента показало, что в переднем двухолмии первая снижается меньше, чем вторая. Эта же тенденция наблюдается и в зрительной области коры, но не двигательной коры депривированных кроликов. Уменьшение величины отношения ГАМК-т к ГДК может косвенно указывать на накопление ГАМК в субклеточных структурах зрительных центров под влиянием световой депривации. Это предположение может быть подтверждено данными Пигаревой и др. об изменении уровня свободных аминокислот в зрительной системе собак после энуклеации [24] и увеличении содержания ГАМК в коре больших полушарий в условиях световой депривации [25]. Накопление ГАМК в этих условиях может быть функционально обусловлено, так как по физиологическим данным у лишенных света животных наблюдалось достоверное снижение амплитуды и вызванных потенциалов на вспышку, выявлена задержка в формировании последовательных стадий образования оборонительного условного рефлекса на свет и т. д. [26].

Данные, полученные в настоящей работе, указывают на роль ГАМК в функционировании зрительной системы кроликов и подтверждают представление о том, что полноценное развитие мозга связано со своевременным поступлением специфической сенсорной импульсации на определенных этапах онтогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bigl V., Biesold D., Weisz K. — J. Neurochem., 1974, v. 55, p. 505. — 2. Globus A., Scheibel A. — Exp. Neurol., 1967, v. 19, p. 331. — 3. Valverde F. — Exp. Brain Res., 1971, v. 3, p. 1. — 4. Vrensen G., De Groot D. — Brain Res., 1974, v. 78, p. 263. — 5. Доведова Е. Л. — В кн.: Функционально-структурные основы системной деятельности и механизмы пластичности мозга. М., 1974, вып. 3, с. 397. — 6. Доведова Е. Л. — Ж. высш. нерв. деят., 1977, т. 27, с. 306. — 7. Curtis D., Johnston G. A. R. — Ergebn. Physiol., 1974, Bd 69, S. 97. — 8. Roberts E. — Biochem. Pharmacol., 1974, v. 23, p. 2637. — 9. De Robertis E. — Science, 1967, v. 156, p. 907. — 10. De Robertis E. — J. Neurochem., 1963, v. 10, p. 225. — 11. Lowry O. U. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265. — 12. Lowe I. P., Robins E., Eyerman G. S. — J. Neurochem., 1958, v. 3, p. 8. — 13. Balazs R., Dahl D., Harwood J. R. — Ibid., 1966, v. 13, p. 897. — 14. Lowry O. H., Roberts N. R., Kapplahn J. I. — J. biol. Chem., 1957, v. 224, p. 1047. — 15. Curtis D., Tebecis A. K. — Exp. Brain Res., 1972, v. 16, p. 210. — 16. Krnjevic N. — Nature, 1970, v. 228, p. 119. — 17. Neal M. J., Iversen L. L. — J. Neurochem., 1969, v. 16, p. 1245. — 18. Bloom F. E., Iversen L. L. — Nature, 1971, v. 229, p. 628. — 19. Tappaz M. L., Brownstein M. J., Palkovits M. — Brain Res., 1976, v. 108, p. 371. — 20. Okada Y. — Ibid., 1974, v. 75, p. 362. — 21. Vrensen G., De Groot D. — Ibid., 1977, v. 134, p. 417. — 22. Герштейн Л. М. — Цитология, 1976, т. 18, с. 48. — 23. Пигарева З. Д., Буснюк М. М., Герштейн Л. М. и др. — В кн.: Вопросы нейрохимии. Л., 1977, с. 31. — 24. Пигарева З. Д., Агаев Т. М., Ибраимова З. Н. — Вopr. мед. химии, 1976, т. 22, с. 228. — 25. Агаев Т. М., Пигарева З. Д. — В кн.: Структурно-функциональные основы организации мозга. М., 1978, вып. 7, с. 106. — 26. Волохов А. А., Шиллягина Н. Н. — Ж. высш. нервн. деят., 1972, т. 22, с. 735.

Поступила 31/VIII 1978 г.

EFFECT OF LIGHT DEPRIVATION ON METABOLISM OF γ -AMINOBUTYRIC ACID IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF RABBIT BRAIN VISUAL SYSTEM

E. Kunert, E. L. Dovedova

Laboratory of Neurochemistry, Institute of Brain, K. Marx University, Leipzig, GDR,
Laboratory of Biohistochemistry, Institute of Brain, Academy of Medical Sciences
the USSR, Moscow

Specific activity of glutamate decarboxylase was decreased in subfractions of light and heavy synaptosomes, and γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase activity — also in subfractions of free mitochondria, isolated from visual zone of brain cortex and of anterior mesencephalon but not from locomotive region of brain cortex of the light-deprived rabbits. Decrease in the ratio GABA transaminase /glutamate decarboxylase indicated distinct inhibition of GABA degradation as compared with its synthesis due to absence of sensory impulsation within the early periods of postnatal ontogenesis of the animals.

УДК 616.13-004.6-07:616.155.1-008.939.22-074

Ю. М. Лопухин, Е. А. Бородин, В. И. Сергиенко, Э. М. Халилов,
А. И. Зюляев, В. А. Люсов, А. И. Арчаков

СОДЕРЖАНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА И КРОЛИКА ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

II Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Исследовано содержание холестерина (ХС) в эритроцитах кроликов с алиментарной гиперхолестеринемией и у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) различной степени тяжести. Установлена прямая зависимость содержания ХС в эритроцитах от уровня гиперхолестеринемии и степени тяжести заболевания. Изменение содержания ХС в расчете на 1 эритроцит и соотношение ХС эритроцитов к ХС плазмы могут служить прогностическим тестом тяжести течения ИБС.

В литературе имеются сведения об изменении строения и функции мембран эритроцитов при гиперлипидемии и гиперхолестеринемии. В мембранах возрастает молярное соотношение холестерин (ХС)/фосфолипиды (Фл) [1, 2], изменяется осмотическая хрупкость эритроцитов [3], увеличивается жесткость мембран, снижается активность Na^+ -, K^+ -АТФ-азы [1].

В настоящей работе изучалось изменение содержания ХС в эритроцитах кроликов с алиментарной гиперхолестеринемией и у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) различной степени тяжести. Предполагалось, что развитие атеросклеротических изменений будет сопровождаться накоплением ХС в эритроцитарной мембране.

М е т о д и к а

Содержание холестерина эритроцитов (ХЭ) определяли по методу Вебстера [4] с предварительной экстракцией его хлороформ-метанольной смесью [5]. Количество холестерина плазмы (ХП) измеряли по методу Мрокоса и Таварека [6]. Уровень фосфолипидов (Фл) измеряли по микрометоду Бартлста [5]. Гиперхолестеринемия у кроликов-самцов вызывалась путем скармливания суспензии холестерина в подсолнечном масле из расчета 0,25 г холестерина на кг веса тела в течение 3 мес.

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

Данные об изменении содержания ХС и Фл эритроцитов и плазмы крови кроликов с алиментарной гиперхолестеринемией суммированы в табл. 1. На основании полученных результатов можно утверждать, что алиментарная гиперхолестеринемия сопровождается резким изменением липидного состава эритроцитарных мембран. Холестерин/фосфолипидный

индекс в эритроцитах животных увеличивается в 2 раза. Естественно, что такое увеличение содержания ХС в эритроцитарной мембране должно приводить к выраженным изменениям ее физических свойств: увеличению вязкости, снижению эластичности и изменению осмотической резистентности. Вполне вероятно, что изменение физических свойств мембраны будет иметь следствием ухудшение функциональной активности эритроцита. Обращает

Т а б л и ц а 1

Содержание ХС и Фл в эритроцитах и плазме крови кроликов с алиментарной гиперхолестеринемией

Животные	Показатель				
	ХП, мг%	ХЭ, $\text{г} \cdot 10^{-13}$	ФЭ, $\text{г} \cdot 10^{-13}$	ХЭ/ФЭ, моль/моль	ХЭ/ХП
Контрольные (5)	76 \pm 3,3	1,8 \pm 0,2	5,0 \pm 0,04	0,7 \pm 0,05	0,9 \pm 0,06
Опытные (10)	740 \pm 100	3,0 \pm 0,4	4,0 \pm 0,3	1,5 \pm 0,4	0,06 \pm 0,01

на себя внимание факт резкого увеличения (в 15 раз) соотношения ХП/ХЭ. Совершенно очевидно, что в случае алиментарной гиперхолестеринемии эритроциты перегружены ХС.

Результаты измерения содержания ХС и Фл в плазме крови и эритроцитах больных ИБС представлены в табл. 2. Все больные были разделены на две группы: больные с клинически удовлетворительным состоянием и больные с тяжелым клиническим состоянием. Из полученных данных вид-

Т а б л и ц а 2

Содержание ХС и Фл в эритроцитах и плазме крови больных ИБС

Обследованные	Показатель				
	ХП, мг%	ХЭ, $\text{г} \cdot 10^{-13}$	ФЭ, $\text{г} \cdot 10^{-13}$	ХЭ/ФЭ, моль/моль	ХЭ/ХП
Больные с клинически удовлетворительным состоянием /8/	180 \pm 8,0	4,3 \pm 0,5	6,3 \pm 0,8	1,5 \pm 0,14	0,8 \pm 0,08
Больные с клинически тяжелым состоянием /2/	185 \pm 5,0	7,4 \pm 0,2	11,2 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1
Доноры /5/	126 \pm 3,0	1,9 \pm 0,13	5,3 \pm 0,4	0,7 \pm 0,05	0,4 \pm 0

но, что содержание ХП крови двух групп больных ИБС одинаково и увеличено (на 50%) по сравнению с группой доноров. В то же время содержание ХС в расчете на 1 эритроцит у тяжелобольных повышается почти в 3 раза. Интересно отметить, что в отличие от экспериментальной гиперхолестеринемии кроликов у человека увеличение содержания ХС в эритроцитарной мембране не сопровождается уменьшением содержания Фл. Наоборот, в группе тяжело больных имеет место увеличение содержания Фл в расчете на 1 эритроцит, но несмотря на это холестерин/фосфолипидный индекс также увеличивается в 2 раза. В то же время с повышением тяжести заболевания имеет место тенденция к увеличению соотношения ХЭ/ХП. При этом в случаях особенно неблагоприятного тяжелого течения ИБС это соотношение увеличивается до 1,2 в сравнении с 0,8 для группы больных с удовлетворительным состоянием и 0,4 у доноров. Повышение содержания ХС в расчете на 1 эритроцит и соотношение ХЭ/ХП могут быть использованы, на наш взгляд, в качестве прогностического теста степени тяжести течения ИБС. Интересно отметить, что увеличение этого показателя у больных ИБС принципиальным образом отличается от такового у кроли-

ков с алиментарной гиперхолестеринемией. Этот факт указывает на неадекватность экспериментальной модели алиментарной гиперхолестеринемии и ИБС.

На основании полученных данных можно утверждать, что перегруженность эритроцитов ХС при алиментарной гиперхолестеринемии и ИБС может иметь существенное значение для понимания роли эритроцитов в клинике и патогенезе атеросклероза. Не исключено, что тяжесть ишемического синдрома в определенной мере может быть связана с изменением функциональных свойств таких эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Demel R. A., de Kruyff B. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 356, p. 109. — 2. Kroes J., Ostwald R., Keith A. — Biochim. Biophys. Acta, 1972, v. 274, p. 71. — 3. Murphy J. R. — J. Lab. clin. Med., 1965, v. 65, p. 765. — 4. Webster D. — Clin. chim. Acta, 1962, v. 7, p. 277. — 5. Кейтс М. Техника липидологии. М., 1975, с. 76. — 6. Mrokos A., Tovarek J. — Cas. Lek., ces., 1958, v. 97, p. 191.

Поступила 7/IX 1978 г.

CONTENT OF CHOLESTEROL IN HUMAN AND RABBIT ERYTHROCYTES IN ATHEROSCLEROSIS AND EXPERIMENTAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

Yu. M. Lopukhin, E. A. Borodin, V. I. Sergienko, E. M. Khalikov, A. I. Zyulyaev, V. A. Lyusov, A. I. Archakov,

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Direct correlation was observed between the content of cholesterol in erythrocytes and the level of alimentary hypercholesterolemia as well as the severity of heart ischemic disease in patients. Data on alterations in cholesterol content in erythrocytes may be used as a prognostic test for development of ischemic impairments of heart.

УДК 612.35.014.46:547.398.81

В. В. Иванов, Г. Ф. Жирнов, Г. И. Бачманова, А. В. Мазуров, А. И. Арчаков

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКРИЛОНИТРИЛА С СИСТЕМОЙ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС

Красноярский медицинский институт, 2-й Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Акрилонитрил (АН) при взаимодействии с цитохромом P-450 микросом образует комплекс с необычными спектральными свойствами. В спектре поглощения этого комплекса присутствует минимум при 400—410 нм и отсутствует четко выраженный максимум. АН стимулирует поглощение кислорода при окислении НАДФН и ингибирует гидроксилирование п-нитроанизола и N-деметилирование диметиланилина. Полученные данные указывают на возможность взаимодействия АН с микросомальной системой окисления.

Необходимость изучения метаболических превращений акрилонитрила (АН; 2-пропеннитрила) — соединения, широко используемого в производстве синтетических материалов, вызвана его высокой токсичностью [1, 2]. Недавно было показано, что местом первичного метаболизма АН является печень [3]. Хорошо известно, что в мембранах эндоплазматического ретикулума печени локализована ферментативная система, окисляющая большинство поступающих извне лекарств и ядов [4, 5]. С целью изучения возможного участия микросомальной гидроксилирующей системы печени в реакциях метаболизма АН исследовали связанные АН с цитохромом P-450, влияние яда на окисление в микросомах некоторых субстратов гидроксилирования и возможность окисления самого яда.

Методика

Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 100—150 г. Животных за 24 ч до опыта лишали пищи. Микросомальную фракцию получали по методу, описанному ранее [6]. Спектры связывания АН с цитохромом Р-450 регистрировали с помощью спектрофотометра Аминко-DW-2 [7] на препаратах микросом крыс, индуцированных фенобарбиталом [8] или метилхолантеном [9]. Определение спектральной константы диссоциации (K_s) и величины максимальной амплитуды спектральных изменений ($\Delta O_{\text{п. макс}}$) проводили в координатах Лайнуивера — Берка [10]. Скорость окисления АН микросомами в присутствии НАДФН исследовали полярографическим методом на полярографе ЛР-60 со стационарным платиновым электродом закрытого типа [11]. Скорость реакции деметилирования диметиланилина (ДМА) определяли, как описано ранее [12]. Гидроксирование *p*-нитроанизола регистрировали на спектрофотометре Хитахи-356 [13]. Блок определяли биуретовым методом [14]. В таблице и на рисунках приведены данные средних величин, полученные на 4—8 препаратах микросом. Каждый препарат объединял материал от двух животных.

Влияние АН на скорость реакций гидроксилирования в микросомах печени крыс

АН, мМ	Скорость гидроксилирования, нмоль/мин на 1 мг белка	
	ДМА, 6 мМ	<i>p</i> -нитроанизол, 0,5 мМ
—	5,0	0,48
1	—	0,34
2	4,8	0,28
4	4,7	0,22
8	—	0,15
10	4,2	—
20	3,9	—
30	3,5	—

Результаты и их обсуждение

Опыты по изучению связывания АН с цитохромом Р-450 проводили на микросомальной фракции неиндуцированных и индуцированных фенобарбиталом или метилхолантеном крыс. Для сравнения регистрировали спектры связывания ДМА и анилина — типичных субстратов цитохрома

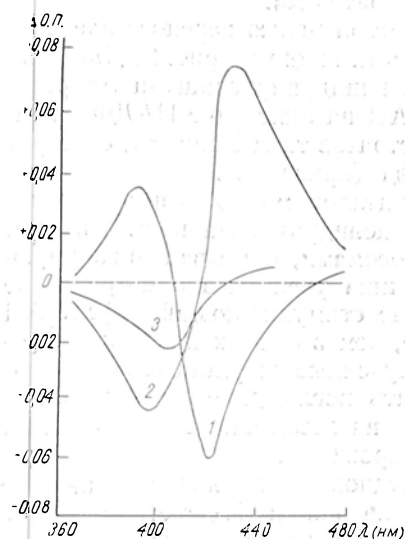


Рис. 1. Спектры связывания АН, ДМА и анилина с микросомами, индуцированными фенобарбиталом.

Инкубационная смесь содержала: 50 мМ *tris*-HCl буфер pH 7,4; 1,2 мг на 1 мл белка микросом; 4 нмоль цитохрома Р-450; 1 мМ ДМА (1), 5 мМ анилина (2); 40 мМ АН (3).

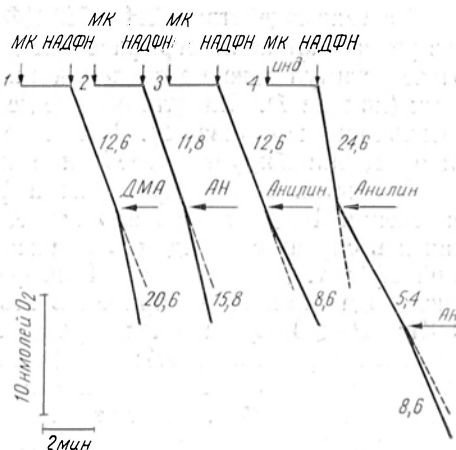


Рис. 2. Влияние ДМА, АН, анилина на скорость потребления кислорода микросомами в присутствии НАДФН.

Инкубационная смесь содержала: 100 мМ *tris*-HCl буфер pH 7,4; 1 мМ ЭДТА; 16 мМ $MgCl_2$. Добавки: МК — 2 мг белка неиндуцированных микросом; МК_{инд} — 2 мг белка микросом, индуцированных фенобарбиталом; НАДФН — 1 мМ, ДМА — 6 мМ; АН — 6 мМ; анилин — 3 мМ. Цифры у кривых — скорость поглощения кислорода (нмоль O_2 мин⁻¹ на 1 мг белка⁻¹).

Р-450. Данные изучения связывания АН с микросомами индуцированных фенобарбиталом крыс приведены на рис. 1. При добавлении ДМА наблюдаются спектральные изменения типа I с максимумом поглощения при

385—390 нм и минимумом при 420—425 нм (кривая 1). Тип II спектральных изменений с минимумом поглощения при 390—395 нм и максимумом при 425—435 нм наблюдается при связывании с цитохромом Р-450 анилина (кривая 2). АН вызывал образование спектров необычного типа с минимумом при 400—410 нм и отсутствием четко выраженного максимума (кривая 3). Аналогичные спектры регистрировались при добавлении АН к неиндуцированным и индуцированным метилхолантrenom микросомам. В настоящее время известны соединения, образующие при связывании с микросомами спектры поглощения, отличные от классических и в то же время сходные с обнаруженными нами для АН. Появление подобного рода спектральных изменений связывается с наложением спектров типов I и II [15].

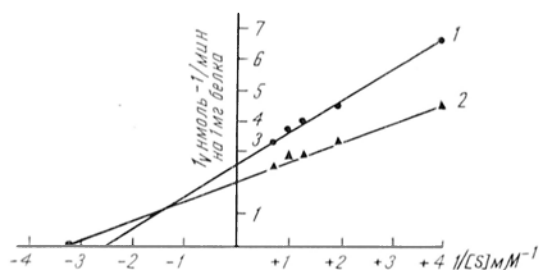


Рис. 3. Скорость образования п-нитрофенола в зависимости от концентрации п-нитроанизола в присутствии (1) и в отсутствии (2) АН.

Инкубационная смесь содержала: 150 мМ КСl; 100 мМ трис-НСl рН 7,6; 10 мМ MgCl₂ и 2 мМ НАДФН. Концентрация белка микросом 1,2 мг/мл. Концентрация АН — 3 мМ.

Была проведена количественная оценка связывания АН с микросомами, индуцированными метилхолантrenom. K_s оказалась равной 200 мМ, что говорит о низком сродстве яда к микросомам по сравнению с типичными субстратами гидроксилирования.

Величина ΔOP_{\max} равнялась $0,02 \text{ см}^{-1}$ нмоль цитохрома Р-450⁻¹ и была близка к значениям, полученным ранее для гексобарбитала и ряда других субстратов [5].

На взаимодействие АН с НАДФН-зависимой цепью переноса электронов указывают полярографические данные. Как видно из рис. 2, ДМА вызывает стимуляцию потребления кислорода неиндуцированными микросомами (кривая 1). Стимулирующее действие АН на окисление НАДФН значительно ниже (кривая 2). В отличие от субстратов типа I анилин, субстрат типа II, ингибирует потребление кислорода (кривая 3).

В опытах с индуцированными фенобарбиталом микросомами скорость окисления НАДФН гораздо выше, чем с неиндуцированными. Анилин, как и в случае с неиндуцированными микросомами, оказывал ингибирующий эффект. Добавление АН на фоне анилина увеличивало потребление кислорода (кривая 4), причем в этом случае стимулирующий эффект АН (59%; $P < 0,05$) выражен гораздо сильнее, чем в опытах на неиндуцированных микросомах (28%; $P < 0,05$). Полученные результаты позволяют утверждать, что АН способен стимулировать поглощение кислорода при окислении НАДФН. Это еще раз указывает на возможное взаимодействие яда с микросомальной системой гидроксилирования.

Другим аргументом в пользу этого предположения является ингибирование АН гидроксилирования п-нитроанизола и N-деметилирования ДМА (см. таблицу). При 3 и 160 мМ соответственно наблюдается 50% ингибирование (II_{50}) этих реакций. Ингибирование N-деметилирования ДМА, очевидно, связано со взаимодействием АН с цитохромом Р-450, так как величины II_{50} и K_s примерно одинаковы. Ингибирование гидроксилирования п-нитроанизола происходит, по-видимому, по другому механизму. Проведенный анализ показал, что АН ингибирует эту реакцию по смешанному типу (рис. 3).

Таким образом, полученные данные указывают на возможность взаимодействия АН с микросомальной системой окисления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grahl R. — Zbl. Arbeitsmed., 1970, Bd 20, S. 379. — 2. Gut I., Корецкий И., Nerudova J. et al. — Pracov. Lek., 1976, v. 28, p. 110. — 3. Gut I., Nerudova J., Корецкий И. — In: International Symposium on Occupational Health in the Production of Artificial Fibres. 4 th. Abstracts. Ed. M. Tolonen. Helsinki, 1976, p. 38. — 4. Gillette J. — Advanc. Pharmacol., 1966, v. 6, p. 220. — 5. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975. — 6. Арчаков А. И., Девиченский В. М., Карузина И. И. и др. — Биохимия, 1968, т. 33, с. 479. — 7. Ullrich V., Estabrook R., Schöderlin J. et al. — Hoppe-Zeyler's Z. physiol. Chem., 1968, Bd 349, S. 1631. — 8. Remmer H., Schenkman J., Estabrook R. et al. — Molec. Pharmacol., 1966, v. 2, p. 187. — 9. Remmer H., Schenkman J., Estabrook R. et al. — Molec. Pharmacol., 1966, v. 2, p. 187. — 10. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М., 1965. — 11. Сергеев П. В., Халилов Э. М., Арчаков А. И. и др. — Бюлл. exper. биол., 1976, № 3, с. 299. — 12. Арчаков А. И., Панченко Л. Ф., Карузина И. И. и др. — Биохимия, 1969, № 3, с. 604. — 13. Richter Ch., Azzi A., Wessler U. et al. — J. biol. Chem., 1977, v. 252, p. 5061. — 14. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976, с. 59. — 15. Orrenius S., Wilson B., von Bahr Ch. et al. — In: Biological Hydroxylation Mechanisms. Ed. G. S. Boyd, R. M. Smellie. London, 1972, p. 55. — 16. Milvy P., Wolff M. — Mutat. Res., 1977, v. 48, p. 271.

Поступила 20/IX 1978 г.

INTERACTION OF ACRYLONITRILE WITH THE SYSTEM OF MICROSOMAL OXIDATION IN RAT LIVER TISSUE

V. V. Ivanov, G. F. Zhirnov, G. I. Bachmanova, A. V. Masurov, A. I. Archakov

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

A complex with unusual spectral properties was formed after interaction of acrylonitrile with microsomal cytochrome P-450. In the absorption spectrum of the complex the minimum was observed at 400-410 nm but no distinct absorption maxima were found. Acrylonitrile stimulated utilization of oxygen during oxidation of NADP and inhibited hydroxylation of p-nitroanizol and N-demethylation of dimethylaniline. The data obtained suggest possibility of interaction of acrylonitrile with the microsomal system of oxidation.

УДК 616.13-004.6-092.9-07:[616.153.96.915+616.132-008.939.629]-074

Е. Н. Герасимова, Т. И. Торховская, Н. В. Перова, Е. А. Базанов

ЛИПОПРОТЕИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ФРАКЦИИ КОЛЛАГЕНА АОРТЫ КРОЛИКОВ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Алиментарная гиперхолестеринемия у большинства кроликов приводила к тотальному атеросклеротическому поражению аорт, увеличению в них количества холестерина (ХС) и коллагена по сравнению с контролем. У животных с менее выраженной гиперхолестеринемией в аортах обнаружены единичные липидные пятна, содержание ХС в аорте было увеличено в меньшей степени; отсутствовали изменения в количестве коллагена по сравнению с контролем. У кроликов с выраженным поражением аорты в липопротеидах низкой плотности (ЛПНП) было резко увеличено количество эфиров ХС, отношение эфиры ХС/белок и эфиры ХС/триглицериды. Последнее свидетельствовало о накоплении подфракции промежуточных ЛП в составе ЛПНП. В липопротеидах высокой плотности (ЛПВП) также было увеличено отношение эфиры ХС/белок и молярное отношение свободный ХС/фосфолипиды. В группе животных, более устойчивых к экспериментальному атеросклерозу, в составе ЛПНП и ЛПВП не было обнаружено резких различий по сравнению с контролем. В ЛП очень низкой плотности, выделенных из плазмы крови животных с различной степенью гиперхолестеринемии, в той же степени, что и в контроле, было увеличено количество эфиров ХС, соотношение ХС/белок, эфиры ХС/белок.

Известно, что различные виды млекопитающих в разной степени подвержены развитию экспериментального атеросклероза. Так, кролики, свиньи, макаки резус и человек менее устойчивы, а крысы и собаки более

устойчивы к развитию атеросклероза. Более того, обнаружены различия в восприимчивости к атеросклерозу внутри одного и того же вида. Так, у 10—15% кроликов не развиваются гиперхолестеринемия и поражение сосудов [1]. Наряду с этим показано, что липопротеиды (ЛП) плазмы крови крыс и собак отличаются от ЛП млекопитающих, более восприимчивых к атеросклерозу [2, 3]. Особенности в изменениях количественного и качественного состава ЛП плазмы крови после введения кортизола были обнаружены нами ранее у кроликов, оказавшихся устойчивыми к развитию атеросклероза [4]. Известно также, что при инкубации культуры артериальных клеток животных с гомологичной гиперхолестеринемической сывороткой скорость включения меченого холестерина (ХС) в эти клетки была значительно выше у свиньи, обезьяны и человека, чем у кролика, крыс и кур [5]. Это могло быть обусловлено различием качественного и количественного состава липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), вызывающих пролиферацию гладкомышечных клеток [6].

Накопление ЛПНП в сосудистой стенке при атеросклерозе сопряжено с увеличением связывания их структурными компонентами соединительной ткани — гликозаминогликанами, гликопротеидами, эластином и коллагеном [7].

Особенности макромолекулярных структур соединительной ткани сосудистой стенки и ЛП плазмы у животных с различной восприимчивостью к атеросклерозу изучены недостаточно.

В связи с вышеизложенным нас интересовало сопоставление изменений количества и состава ЛП плазмы крови с изменениями содержания ХС и фракций коллагена в аорте кроликов при различной выраженности гиперхолестеринемии и атеросклеротического повреждения. Особое внимание было обращено на сопоставление качественного и количественного состава ЛП, транспортирующих ХС в сосудистую стенку — ЛПНП и ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) — и липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) [8—11] осуществляющие, по современным представлениям, отток ХС.

Методика

Исследования были проведены на 24 кроликах-самцах породы шиншилла весом 2,5—3 кг. Экспериментальный атеросклероз у 13 из них вызывали скормливанием ХС из расчета 0,2 г на 1 кг веса животного. 11 кроликов служили контролем. Через 4,5 мес животных забивали. Степень поражения аорты оценивали визуально и по количеству ХС и коллагена в грудном и брюшном отделах аорты [8]. В зависимости от степени поражения аорт кролики были разделены на две группы: с единичными липидными пятнами и полосами — 1-я группа ($n = 5$) и с выраженным атеросклеротическим поражением аорты на всем ее протяжении — 2-я группа ($n = 8$). Разделение коллагена на фракции (солеорастворимую, кислоторастворимую и нерастворимую) осуществляли по Вейсману [12]. Содержание коллагена во фракциях выражали в микрограммах оксипролина (ОП) на 1 мг сухой обезжиренной ткани. Белково-связанный оксипропилин (БсвОП) и свободный оксипролин (СвОП) в плазме крови определяли методом А. А. Крель и Л. Н. Фурцевой с использованием колоночной хроматографии [13]. ОП определяли химическим методом Стэгемана [14], концентрацию его в крови выражали в микрограммах на 1 мл.

Препараты ЛП отдельных классов выделены И. А. Щербаковой с помощью последовательного препаративного ультрацентрифугирования в растворах солей следующих плотностей: ЛПОНП — 1,006 г/мл, ЛПНП — 1,063 г/мл, ЛПВП — 1,21 г/мл [15].

Концентрация ХС и триглицеридов (ТГ) в плазме крови и выделенных препаратах ЛП, а также эфиров ХС после разделения на тонком слое силикагеля определена на автоанализаторе АА II фирмы «Техникон» В. А. Полесским. Содержание ХС в аортах установлено микрометодом [16] Н. В. Котелевцевой.

Количество фосфолипидов (Фл) определяли по методу Svannborg [17]. Белок по Lowry [18] после делипидации препаратов ЛП органическими растворителями [19] определен Н. П. Чернышевой.

Результаты исследований

Результаты исследований содержания ХС и фракций коллагена в грудном и брюшном отделах аорты животных представлены в табл. 1. Как вид-

но, наиболее резко содержание ХС было изменено в аорте кроликов с выраженным атеросклерозом (2-я группа): в грудном отделе оно было увеличено в 6 раз, а в брюшном — почти в 3 раза по сравнению с таковым у контрольных животных. Содержание ХС в аорте кроликов с менее выраженным атеросклерозом (1-я группа) было изменено не столь значительно. Оно было увеличено лишь в 3 раза в грудном отделе, а в брюшном не отличалось от такового в контрольной группе.

Определение содержания солерастворимого коллагена использовали для оценки синтеза тканевого коллагена, накопление которого происходит параллельно увеличению активности пролигидроксилазы и увеличению превращения ^{14}C -пролина в ^{14}C -оксипролин [20, 21]. Кроме того, мы сочли целесообразным определить содержание в плазме БсвОП и СвОП, поскольку в экспериментальных исследованиях с использованием ^{14}C -пролина показано, что БсвОП в большей степени отражает синтез коллагена, тогда как свободный ОП — его распад [22, 23].

Содержание солерастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты кроликов 2-й группы составляло соответственно $41,8 \pm 3,61$ и $62,5 \pm 7,12$ мкг оксипролина на 1 мг сухой обезжиренной ткани, т. е. было большим ($P < 0,001$), чем у контрольных животных. В противоположность этому в аналогичных отделах аорт у животных 1-й группы содержание коллагена не отличалось от такового у животных контрольной группы (см. табл. 1).

Концентрация БсвОП была увеличена в плазме крови как у животных 2-й ($11,4 \pm 0,76$ мкг/мл; $P < 0,001$), так и у животных 1-й группы ($7,6 \pm 0,57$ мкг/мл; $P < 0,02$) по сравнению с таковой у контрольных кроликов ($5,7 \pm 0,37$ мкг/мл). Однако во 2-й группе концентрация БсвОП была увеличена более значительно, чем в 1-й группе ($P_{1-2} < 0,01$). Таким образом, наряду с обширным и резко выраженным атеросклерозом у кроликов 2-й группы содержание ХС и солерастворимого коллагена в аорте, а также концентрация БсвОП

Т а б л и ц а 1
Содержание холестерина и коллагена в аорте и концентрация оксипролина в плазме крови

Группа животных	ХС, мкг на 1 мг сухой обезжиренной ткани		Коллаген аорты, мкг ОП на 1 мг сухой обезжиренной ткани						ОП плазмы крови, мкг/мл	
	грудной отдел	брюшной отдел	солерастворимый		кислоторастворимый		нерастворимый		свободный	белково-связанный
			грудной отдел	брюшной отдел	грудной отдел	брюшной отдел	грудной отдел	брюшной отдел		
Контроль (n=11)	10,4±1,72	15,3±2,18	15,4±1,52	32,6±1,76	25,3±1,14	43,4±4,63	2050±210	4920±320	2,0±0,07	5,7±0,37
1-я (n=5)	30,2±5,99	18,8±5,63	25,5±6,48	32,8±5,72	30,9±4,68	53,5±2,58	1800±240	5190±270	2,6±0,13	7,6±0,57
2-я (n=8)	60,3±8,55	39,6±5,32	41,8±3,61	62,5±7,12	48,8±5,97	39,4±3,33	3600±450	7300±510	2,8±0,14	11,4±0,76
P ₁₋₂	<0,02	<0,02	<0,05	<0,02	<0,05	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001	<0,01
P _{1-K}	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001	<0,02
P _{2-K}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01

в крови были увеличены по сравнению с таковыми у животных 1-й группы, в сосудах которых отмечались только единичные жировые полосы.

Для выяснения вопроса о том, что является причиной различного содержания солерастворимого коллагена в аортах исследуемых групп животных — преобладание синтеза коллагена, изменение его созревания или замедление катаболизма — было определено и содержание двух других, более зрелых фракций коллагена, а именно нерастворимой и кислоторастворимой, а также концентрация СвОП в плазме крови.

Как видно из табл. 1, содержание наиболее зрелого, нерастворимого коллагена было увеличено лишь в аорте кроликов 2-й группы. В 1-й группе оно не отличалось от такового у контрольных животных.

Т а б л и ц а 2

Концентрация общего ХС и компонентов ЛПНП и ЛПОНП, выделенных из плазмы крови кроликов (в мг%)

		Группа животных		
		Контроль	1-я	2-я
Плазма	ХС	24,5±1,22	441±116,8	723±80,2
	P_K		<0,0001	<0,001
	P_{1-2}			<0,01
ЛПНП	ХС	8,2±3,27	178±42,1	365±37,3
	P_K		<0,01	<0,001
	P_{1-2}			<0,01
	Белок	5,3±0,59	97,8±27,34	140±14,75
	P_K		<0,01	<0,001
	P_{1-2}			>0,1
ЛПОНП	ФЛ	5,9±1,9	118,8±40,2	202,1±39,2
	P_K		<0,01	<0,01
	P_{1-2}			>0,1
	ХС	3,6±0,36	178,1±69,30	272±39,6
	P_K		<0,05	<0,001
	P_{1-2}			>0,1
	Белок	5,2±0,8	43,8±10,36	64,2±6,44
	P_K		<0,01	<0,001
	P_{1-2}			>0,1
	ФЛ	5,4±1,1	93,6±28	162,0±25,7
	P_K		<0,001	<0,01
	P_{1-2}			0,05<P<0,1

При определении содержания кислоторастворимого коллагена, представляющего одну из промежуточных ступеней на пути превращения молодого, вновь синтезированного коллагена в зрелый, нерастворимый [24, 25], было обнаружено его увеличение в грудном отделе и отсутствие изменений в брюшном отделе кроликов 2-й группы по сравнению с контрольными животными. У животных 1-й группы содержание кислоторастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах не отличалось от такового в соответствующих отделах аорты контрольных кроликов (см. табл. 1).

При этом концентрация СвОП в плазме крови животных 1-й и 2-й групп была в равной степени повышена по отношению к таковой в крови контрольных животных.

При одинаковой степени увеличения уровня СвОП в плазме крови животных 1-й и 2-й групп концентрация БсвОП была более значительно повышена у кроликов 2-й группы. Это привело к различию в отношении БсвОП/СвОП: во 2-й группе оно составляло 4,5±0,60, а в 1-й — 3,0±0,27 ($P < 0,05$).

Наряду с определением показателей выраженности атеросклероза, количества ХС и коллагена в сосудистой стенке животных 1-й и 2-й групп было определено содержание в плазме ХС, а также компонентов фракций

ЛП — ЛПНП и ЛПОНП, осуществляющих в основном приток ХС, и ЛПВП, которые обеспечивают его отток из сосудистой стенки [8—11].

Результаты исследований представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, количество общего ХС в плазме крови было увеличено у кроликов 1-й и 2-й групп, достигая наибольшей величины в последней. Гиперхолестеринемия обуславливалась увеличением содержания ХС атерогенных классов ЛП — ЛПНП и ЛПОНП. Повысилось также количество белка и Фл этих классов ЛП по сравнению с таковым у животных контрольной группы. Увеличение концентрации каждого из трех основных ингредиентов ЛПОНП и ЛПНП животных с экспериментальным атеросклерозом — ХС, Фл и белка — свидетельствует об увеличении коли-

Т а б л и ц а 3

Состав ЛПНП и ЛПОНП (в %)

		Группа животных		
		Контроль	1-я	2-я
ЛПНП	Белки	26,0±1,8	22,0±1,4	13,9±2,0
	P_K		>0,1	<0,01
	P_{1-2}			<0,01
	Эфиры ХС	30,1±2,2	31,4±2,4	43,5±2,3
	P_K		>0,1	<0,01
	P_{1-2}			<0,01
	Неэтерифицированный ХС	7,1±0,9	13,9±2,8	18,7±1,3
	P_K		<0,05	<0,01
	P_{1-2}			>0,1
	ТГ	12,0±1,7	4,8±1,6	4,0±1,1
	P_K		<0,05	<0,05
	P_{1-2}			>0,1
	Фл	28,0±2,1	23,2±1,5	24,4±1,7
	P_K		>0,1	>0,1
	P_{1-2}			>0,1
ЛПОНП	Белки	16,4±0,7	12,4±0,6	11,4±0,6
	P_K		<0,01	<0,01
	P_{1-2}			>0,1
	Эфиры ХС	14,5±0,8	44,7±3,6	42,4±2,4
	P_K		<0,01	<0,01
	P_{1-2}			>0,1
	Неэтерифицированный ХС	7,3±2,2	15,4±3,6	18,4±2,6
	P_K		<0,1	<0,05
	P_{1-2}			>0,1
	ТГ	43,8±1,9	4,1±0,4	6,0±2,5
	P_K		<0,001	<0,001
	P_{1-2}			>0,1
	Фл	18,0±1,1	23,4±1,2	21,8±1,6
	P_K		>0,1	>0,1
	P_{1-2}			>0,1

чества частиц каждого из этих классов ЛП в плазме крови животных как 1-й, так и 2-й группы. Наряду с этим обращало на себя внимание, что уровень ХС ЛПНП у животных 2-й группы был в 2 раза выше, чем у животных 1-й группы ($P < 0,01$).

В противоположность этому не обнаружилось достоверных различий между кроликами 1-й и 2-й групп по количеству ХС, белка и Фл ЛПОНП. Следовательно, наибольшая степень гиперхолестеринемии во 2-й группе по сравнению с 1-й была обусловлена преимущественно различием в количестве ХС ЛПНП.

Определение состава ЛПОНП и ЛПНП, а именно процента эфиров ХС, свободного ХС, триглицеридов (ТГ), Фл и белка от суммарного их количества, принятого за 100%, также выявило определенные особенности. Как видно из результатов исследований, представленных в табл. 3, изме-

нения процентного состава ЛПОНП были выражены в одинаковой степени у животных 1-й и 2-й групп по сравнению с контролем. При этом в наибольшей степени парастало процентное содержание эфиров ХС — в 1-й группе до $44,7 \pm 3,6\%$, во 2-й — до $42,4 \pm 2,4\%$ по сравнению с $14,5 \pm 0,8\%$ в контроле. Подобные изменения в составе ЛПОНП у кроликов, получавших ХС, наблюдались и ранее [27].

В противоположность ЛПОНП в процентном составе ЛПНП, выделенных из плазмы крови кроликов 1-й и 2-й групп, были обнаружены различия. Процент белка был снижен, а процент эфиров ХС увеличен в ЛПНП кроликов 2-й группы по сравнению с таковым в 1-й. Это привело к увеличению отношения эфиры ХС/белок в ЛПНП до $2,8 \pm 0,25$ во 2-й группе по сравнению с таковым в 1-й группе — $1,8 \pm 0,35$ ($P < 0,05$). В контроле эта величина составила $1,7 \pm 0,33$ (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

Соотношения структурных компонентов ЛПНП и ЛПОНП

		Группа животных		
		контроль	1-я	2-я
ЛПНП	ХС/белок	$1,9 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,42$	$2,7 \pm 0,22$
	P_K		$>0,1$	$>0,1$
	P_{1-2}		$>0,1$	$>0,1$
	Эфиры ХС/белок	$1,7 \pm 0,38$	$1,8 \pm 0,35$	$2,8 \pm 0,25$
	P_K		$>0,1$	$<0,05$
	P_{1-2}			$<0,05$
	Эфиры ХС/ТГ	$2,5 \pm 1,0$	$8,0 \pm 3,0$	$25,0 \pm 8,8$
	P_K		$<0,1$	$<0,01$
ЛПОНП	P_1			$0,05 < P < 0,1$
	ХС/белок	$1,0 \pm 0,17$	$4,1 \pm 1,18$	$4,2 \pm 0,08$
	P_K		$<0,05$	$<0,001$
	P_{1-2}		$>0,1$	$>0,1$
	Эфиры ХС/белок	$1,1 \pm 0,23$	$3,9 \pm 1,05$	$3,6 \pm 0,24$
	P_K		$<0,02$	$<0,001$
	P_{1-2}		$>0,1$	$>0,1$
	Эфиры ХС/ТГ	$0,3 \pm 0,11$	$15,8 \pm 7,0$	$17,8 \pm 6,0$
	P_K		$<0,05$	$<0,01$
	P_{1-2}			$>0,1$

Обращало на себя внимание резкое увеличение отношения эфиры ХС/ТГ ЛПНП во 2-й группе; оно достигло $25,0 \pm 8,8$. Это отношение в 1-й группе составило $8,0 \pm 3,04$ и не отличалось от такового в контрольной группе. Его увеличение характерно для ЛП промежуточной плотности [26], которые накапливаются, как известно, в плазме крови кроликов с гиперхолестеринемией [27]. Выявленные изменения в составе и соотношении компонентов ЛПНП кроликов 2-й группы были близки к отмеченным ранее [27] у кроликов с экспериментальным атеросклерозом, в то время как в 1-й группе состав ЛПНП не менялся по сравнению с контролем.

Следующая часть исследований касалась определения уровней ХС, Фл и белка ЛПВП. Результаты, представленные в табл. 5, показывают, что содержание ХС ЛПВП у животных 1-й группы не отличалось от такового в контроле. Количество ХС ЛПВП у животных 2-й группы имело тенденцию к повышению по сравнению с таковым у животных 1-й группы. В противоположность этому количество белка ЛПВП у кроликов 2-й группы было снижено по сравнению с таковым в 1-й группе ($P < 0,05$), а количество Фл у животных обеих групп было одинаковым.

Соотношения ХС/белок и эфиры ХС/белок в ЛПВП 1-й группы животных не отличались от таковых в контроле и значительно возрастали во 2-й группе (соответственно в 2,6 и 3,5 раза по сравнению с 1-й группой).

Определение молярного отношения свободный ХС/Фл, характеризующего жидкость поверхностного слоя ЛПВП [28], показало, что у животных 2-й группы оно увеличилось по сравнению с таковым у животных 1-й группы и составило $0,80 \pm 0,09$; в 1-й группе эта величина равнялась $0,34 \pm 0,05$ ($P < 0,001$), в контроле — $0,31 \pm 0,05$. Следовательно, разнонаправленные изменения в концентрации белковых и липидных компонентов ЛПВП, выделенных из плазмы крови кроликов 2-й группы, привели к различию в соотношении эфиры ХС/белок, ХС/белок, а также свободный ХС/Фл, что свидетельствует о насыщении ХС ЛПВП животных 2-й группы.

Т а б л и ц а 5

Содержание отдельных компонентов (в мг на 100 мл плазмы) и их соотношения в ЛПВП

		Группа животных		
		контроль	1-я	2-я
Концентрация, мг%	ХС	$9,1 \pm 1,59$	$10,5 \pm 1,32$	$18,0 \pm 3,84$
	P_K			
	P_{1-2}			$0,05 < P < 0,1$
	Белок	$115 \pm 16,42$	$101,9 \pm 6,33$	$78,0 \pm 8,37$
	P_K			$0,05 < P < 0,1$
	P_{1-2}			$< 0,05$
Соотношение компонентов	Фл	$14,7 \pm 1,6$	$16,8 \pm 2,6$	$19,1 \pm 3,0$
	P_K			
	P_{1-2}			
	ХС/белок	$0,06 \pm 0,016$	$0,1 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,051$
	P_K		$> 0,1$	$< 0,01$
	P_{1-2}			$< 0,02$
	Эфиры ХС/белок	$0,07 \pm 0,017$	$0,09 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,09$
	P_K		$> 0,1$	$< 0,02$
	P_{1-2}			$< 0,05$

Обсуждение

Сравнение показателей степени атеросклероза (количество ХС и коллагена в аорте) с количеством и составом ЛП — как приносящих в аорту ХС (ЛПОНП и ЛПНП), так и удаляющих его из сосудистой стенки (ЛПВП) — у двух групп кроликов с различной выраженностью поражения аорт выявило определенные закономерности.

У животных с тотальным атеросклеротическим поражением аорты (2-я группа) наряду со значительным накоплением ХС в грудном и брюшном отделах наблюдалось также и возрастание уровня коллагена в них, особенно «молодых» его форм, что указывало на преобладание у этих животных синтеза коллагена над распадом.

У кроликов с единичными липидными пятнами в аорте (1-я группа) отмечалось небольшое возрастание содержания ХС только в грудном отделе аорты при отсутствии изменений в количестве фракций коллагена по сравнению с контрольной группой.

Наряду с выявленными различиями вышеуказанных показателей в аортах животные этих двух групп отличались также по степени гиперхолестеринемии плазмы, что было показано ранее [1]. Однако следует подчеркнуть, что нами обнаружены различия в характере распределения ХС между отдельными классами ЛП у кроликов 1-й и 2-й групп. Так, при резком нарастании ХС ЛПНП у кроликов обеих групп во 2-й группе концентрация ХС ЛПНП плазмы была в два раза выше, чем в 1-й. Помимо этого, относительный уровень ХС, особенно эфиров ХС, в составе ЛПНП кроликов 2-й группы был выше, чем у кроликов 1-й группы, а относительное количество белка — ниже. Обнаруженное при этом резкое возрастание отношения эфиры ХС/ТГ в ЛПНП животных 2-й группы указывало на высокое содер-

жание в этой фракции ЛП промежуточной плотности (1,006—1,019 г/мл), обогащенных эфирами ХС и аргинин — богатым белком, что характерно для кроликов с экспериментальным атеросклерозом [27]. Эти промежуточные ЛП входили в состав препаратов ЛПНП при использовании нами методе их выделения [15].

Известно, что указанная промежуточная субфракция наряду с ЛПОНП и ЛПНП также обладает атерогенными свойствами. Так, в опытах с культурой гладкомышечных клеток, эндотелия и фибробластов показано, что ЛПНП и ЛП промежуточной плотности повышают накопление и этерификацию ХС в клетках [8—10].

Обнаруженное нами увеличение содержания в плазме фракций ЛПНП и ЛП промежуточной плотности и обогащение их эфирами ХС у животных 2-й группы обуславливает, по-видимому, более интенсивное поступление ХС в аорту и в мембраны гладкомышечных клеток и тем самым способствует развитию атеросклеротического процесса, резко выраженного в этой группе.

Состав и соотношение липидных и белковых компонентов ЛПНП, выделенных из плазмы крови животных 1-й группы, были такими же, как и в контроле. Наряду с этим в грудном и брюшном отделах аорт были только единичные липидные полосы и пятна, что связано, очевидно, со значительно меньшим поступлением ХС с ЛПНП и промежуточными ЛП в сосудистую стенку животных 1-й группы.

Второе принципиальное различие между животными 1-й и 2-й групп касалось ЛПВП, осуществляющих отток ХС от мембран гладкомышечных клеток [11]. Так, у животных 2-й группы при тенденции к увеличению ХС ЛПВП было выявлено резкое увеличение соотношения ХС/белок и особенно эфиры ХС/белок по сравнению с этим показателем в ЛПВП животных 1-й группы.

При обсуждении возможных причин повышения содержания эфиров ХС ЛПВП не было оснований думать, что оно связано с увеличением активности лецитин-холестеринацилтрансферазы, так как активность этого фермента очень низка у кроликов и не повышается при развитии экспериментального атеросклероза [29]. Можно полагать, что транспорт эфиров ХС от ЛПВП к ЛПОНП, имеющий место в плазме крови в норме [26], был снижен в результате насыщения ЛПОНП эфирами ХС у животных 2-й группы (см. табл. 3). Это, по-видимому, способствовало высокому содержанию в ЛПВП эфиров ХС.

В опытах с культурой гладкомышечных клеток и фибробластов показано, что аналогичные изменения в составе ЛПВП при экспериментальной гиперхолестеринемии нарушают характер взаимодействия частиц ЛПВП с этими клетками. При этом ЛПВП не только не снижают содержания ХС в клетках, но напротив, как и ЛПНП, повышают накопление и этерификацию в них ХС [10].

Одной из причин, могущих привести к нарушению способности ЛПВП кроликов 2-й группы удалять ХС, может быть обнаруженное повышение молярного отношения свободный ХС/Фл в ЛПВП до 0,8. Величина эта, соответствующая таковой в ЛПНП [30], указывает на снижение жидкостности поверхностного слоя ЛПВП животных 2-й группы [28]. Снижение жидкостности поверхностного фосфолипид-холестеринового монослоя ЛПВП может, по-видимому, препятствовать физико-химическому обмену ХС с клеточными мембранами, как это было ранее обнаружено в модельных системах [30].

Таким образом, более резкое увеличение уровня эфиров ХС ЛПНП и ЛП промежуточной плотности, а также обогащение эфирами ХС и свободным ХС ЛПВП у животных 2-й группы позволяет полагать, что у этих животных значительно повышено поступление ХС в мембраны гладкомышечных клеток и снижен его отток, что служит причиной накопления ХС в гладкомышечных клетках.

Отдельного обсуждения заслуживает различие в содержании фракций коллагена в аортах животных 1-й и 2-й групп. Данные о содержании отдельных фракций дают основание полагать, что обмен коллагена в грудном и брюшном отделах аорты кроликов 2-й группы существенно отличается от метаболизма его в сосудистой стенке не только контрольных животных, но и кроликов 1-й группы. Так, у животных 2-й группы накопление солерастворимого коллагена в грудном и брюшном отделах аорты, а также увеличение отношения белково-связанного ОП к СвОП в плазме крови свидетельствуют о том, что усилен как синтез, так и распад коллагена, однако синтез усилен больше, чем распад.

Увеличение концентрации БсвОП и СвОП в крови животных 1-й группы позволяет полагать, что и у этих животных изменен обмен коллагена. При этом отсутствие изменений в содержании исследуемых фракций в аорте по сравнению с контролем, а также в отношении БсвОП/СвОП в плазме крови свидетельствует о том, что в аорте кроликов 1-й группы синтез и распад коллагена усилены в равной мере.

При этом именно у животных 2-й группы, у которых увеличение синтеза превышало увеличение распада, обнаружено резкое поражение атеросклеротическим процессом грудного и брюшного отделов аорты на всем их протяжении. У животных 1-й группы, у которых усиление синтеза сопровождалось нарастанием катаболизма, найдены лишь отдельные липидные пятна, причем только в грудном отделе аорты.

Результаты этих исследований позволяют думать, что различия в степени выраженности атеросклероза у животных 1-й и 2-й групп, возможно, связаны с особенностями активности по отношению к ЛП плазмы гладкомышечных клеток, в которых осуществляется синтез коллагена, или (и) с различием в активности ферментных систем, осуществляющих его распад. Обнаруженная нами разница в составе ЛП, осуществляющих приток ХС к стенкам сосудов и его отток от них, и в обмене коллагена у животных обеих групп дает основание полагать, что устойчивость к развитию атеросклероза у кроликов одной из этих групп может быть связана как с особенностями обмена ЛП плазмы, так и с особенностями обмена коллагена в сосудистой стенке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ловягина Т. Н. Липопротеиды и атеросклероз. Дис. докт., Л., 1974.
2. Hawel R. J. — *Cardiovasc. Res. Cent. Bull.*, 1977, v. 15, p. 93—97. — 3. Solyom A., Bradford R. H., Furman K. H. — *Am. J. Physiol.*, 1971, v. 221, p. 1587—1595. — 4. Ицербаклова И. А., Герасимова Е. Н., Перлова Н. В. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1975, № 6, с. 589—592. — 5. Robertson A. L. Jr. — In: *Atherosclerosis III*. Ed. G. Shettler, A. Weizel. Berlin, 1974, p. 218—226. — 6. Fischer-Dzoga K. — *Ibid.*, p. 172—174. — 7. Hoff H. F., Titus J. L., Bajardo R. J. et al. — *Arch. Path.*, 1975, v. 99, p. 253—258. — 8. Weinstein D. B., Carew T. E., Steinberg D. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 424, p. 404—421. — 9. Carew T. E., Koschinsky T., Hayes N. B. et al. — *Lancet*, 1976, v. 1, p. 1315—1317. — 10. Assman G., Brown B. G., Makley R. W. — *Biochemistry (Wash.)*, 1975, v. 18, p. 3996—4002. — 11. Stein Y., Glageaud M. C., Fainary M. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1975, v. 380, p. 106—118. — 12. Weissman N., Shild G. S., Carnes W. N. — *J. biol. Chem.*, 1963, v. 238, p. 3—5. — 13. Крель А. А., Фурцева Л. Н. — *Вопр. мед. химии*, 1968, № 6, с. 635—640. — 14. Stegemann H. — Hoppe — Seyler's *Z. physiol. Chem.*, 1958, Bd 311, S. 41—45. — 15. Lindgren F. T. — In: *Analysis of Lipids and Lipoproteins*. Ed. E. G. Perkins. Champaign, 1975, p. 204—224. — 16. Abell L. L., Levy B. B., Brodie B. B. et al. — *J. biol. Chem.*, 1952, v. 195, p. 357—360. — 17. Svannborg A., Svennerholm M. — *Acta med. scand.*, 1964, v. 25, p. 72—76. — 18. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265—275. — 19. Kane J. P., Sata T., Hamilton R. L. et al. — *J. clin. Invest.*, 1975, v. 56, p. 1622—1634. — 20. Fuller G. C., Matoney A. L., Fisher D. O. et al. — *Atherosclerosis*, 1976, v. 24, p. 483—490. — 21. Langer R. O., Modrak J. B. — *Ibid.*, p. 149—153. — 22. Frey J. — In: *Federation of European Biochemical Societies. Meeting. 6th. Abstracts*, 1968, p. 9. — 23. Le Roy E. C., Carbone P. R., Sjoerdyk A. — *J. Lab. clin. Med.*,

- 1966, v. 67, p. 891, 57. — 24. Мазуров В. И., Орехович В. Н. — Биохимия, 1959, т. 24, № 1, с. 33. — 25. Gross J. et al. — In: Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis. New York, 1963, p. 175. — 26. Eisenberg S. — In: Atherosclerosis Reviews. Ed. R. Paoletti; A. M. Gotto. New York, 1976, v. 1, p. 23—60. — 27. Shore V. G., Shore B., Hart R. G. — Biochemistry (Wash.), 1974, v. 13, p. 1579—1585. — 28. Demel R. A., Van Deenen L. L. M., Petricha B. A. — Biochim. biophys. Acta, 1967, v. 135, p. 11—19. — 29. Stokke K. T. — Atherosclerosis, 1974, v. 19, p. 393—406. — 30. Arbogast L. Y., Rothblat G. H., Leslie M. H. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 73, p. 3680—3684.

Поступила 29/IX 1978 г.

LIPOPROTEINS FROM BLOOD PLASMA AND COLLAGEN FRACTIONS FROM AORTA OF RABBITS WITH VARIOUS DEGREE OF ATHEROSCLEROSIS

E. N. Gerasimova, T. I. Torkhovskaya, N. V. Perova, E. A. Basanov

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

Content of cholesterol and of collagen fractions (salt-, acid soluble and insoluble) in thoracic and peritoneal parts of aorta as well as concentration of products of collagen metabolism (protein-bound and free hydroxyproline) in blood plasma were studied in rabbits with various degree of atherosclerosis — separate lipid spots in aorta thoracic part (I group), total impairment of aorta (II group) and in control animals. Concentration of cholesterol and triglycerides was also studied in blood plasma and content of cholesterol, cholesterol and triglyceride esters, phospholipids and protein was measured in separate types of lipoproteins — lipoprotein of low (LPLD), of very low (LPVLD) and of high density (LPHD). Increase in content of cholesterol, salt-soluble and insoluble collagen from the both parts of aorta as well as in concentration of protein-bound and free hydroxyproline was found in rabbits of the II group as compared with the control animals. In animals of the I group content of collagen fractions in aorta was similar to that of control animals. Hypercholesterolemia, observed in both groups of rabbits, was most distinct in the II group, being related to the higher amount of cholesterol in LPLD fraction. The ratio of cholesterol esters, free cholesterol, triglycerides and phospholipids was similarly altered in LPVLD fraction of the groups of animals, mainly due to an increase in content of cholesterol esters. But rabbits of the I group were distinct from the II group of animals in the ratio of these components in LPLD: relative content of protein was lower and of cholesterol esters — higher in LPLD of the II group than of the I group. The data suggest that LPLD contained high amount of lipoproteins of intermediate density and cholesterol deposited into vessel wall from LPLD and lipoproteins of intermediate density at the increased rate. In LPHD from blood plasma of rabbits of the II group the ratios cholesterol/protein, cholesterol esters/protein as well as the molar ratio free cholesterol/phospholipids were increased; these data suggest that LPHD was saturated with cholesterol and LPHD appeared to lose the ability to eliminate cholesterol from the vessel wall. Differences in the degree of atherosclerotic impairments, existing between the I and II groups of animals, were apparently related to the variations in composition and content of lipoproteins, which regulate the level of cholesterol in vessel wall, as well as to content of collagen, i. e. they were due to features of metabolism of lipoproteins in blood plasma and of collagen in the vascular wall.

УДК 616.36-006-092.9-07:616.36-008.931-07

В. Н. Гобеев, Т. Т. Березов

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ГЛИКОЛИЗА И ДЫХАНИЯ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХИМИЧЕСКОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

Определяли активность гексокиназы (ГК), глюкокиназы (ГЛК), цитохромоксидазы (ЦО), а также количество белка митохондрий (МХ) и особенности субклеточного распределения ГК в печени крыс при введении им ацетиламинофлуорена и диэтилнитрозамина. Показано, что в первичных индуцированных гепатомах активность

всех ферментов изменяется в ту же сторону, как и в случае перевиваемых штаммов опухолей печени. Во всех первичных гепатомах отсутствует ГЛК и обнаружена фракция ГК, связанной с мембранами МХ, что сближает эти опухоли с печенью эмбрионов, различными другими тканями взрослых животных и перевиваемыми гепатомами. Свойства связанной ГК первичных гепатом при солюбилизации ее посредством АТФ такие же, как и у эмбриональной печени.

Ранее было показано, что в разных штаммах перевиваемых гепатом с разной скоростью роста активность глюкокиназы (ГЛК) не выявляется, резко снижается активность цитохромоксидазы (ЦО), а активность гексокиназы (ГК) увеличивается в 5—100 раз. Установлено также, что во всех гепатомах появляется фракция ГК, прочно связанной с мембранами митохондрий (МХ) и отсутствующей в нормальной и регенерирующей печени взрослых мышей и крыс [1, 2]. В то же время в других тканях взрослых животных и в печени эмбрионов основная часть ГК прочно связана с МХ [2—5], т. е. появление в перевиваемых гепатомах связанной с мембранами ГК указывает на процесс биохимической дисдифференцировки гепатоцитов при малигнизации. Остается, однако, неясным, имеется ли ГК, связанная с МХ, уже в первичных индуцированных гепатомах или она появляется при пассировании опухолей, т. е. представляет собой отдаленное следствие прогрессии. Данная работа посвящена решению этого вопроса.

М е т о д и к а

Опыты проводили на крысах линии Вистар. Гепатомы индуцировали скормливанием им ацетиламинофлуорена (ААФ) или внутрибрюшинным введением диэтилнитрозамина (ДЭНА) в дозе 50 мг/кг еженедельно в течение 16 нед. Животных с ААФ содержали на специальной синтетической диете, содержащей глюкозу, казеин, витамины и соли. Применение такой диеты резко ускоряет и увеличивает выход у крыс опухолей. Животных с ДЭНА содержали на обычном рационе вивария. Всего было использовано 52 крысы, которые были разбиты на четыре группы: 1-я — контрольная группа (10 крыс); 2-я — крысы, содержавшиеся на синтетической диете без ААФ (10); 3-я — крысы, которым вводили ДЭНА (12); 4-я — крысы, получавшие синтетическую диету с ААФ (20).

Методы получения субклеточных фракций и определения активности ГК, ГЛК и ЦО были описаны ранее [1]. Белок определяли биуретовым методом в модификации Гоа [6].

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

Полученные данные представлены в табл. 1 и 2. Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что в печени крыс, содержащихся на синтетической диете без канцерогена, активность ГК практически не изменяется, в то время как активность ГЛК и ЦО снижается соответственно в 2,2 и 1,8 раза. Одновременно уменьшается количество белка в субфракциях печени. Следует отметить, что изменение всех перечисленных параметров происходит в этой группе крыс в том же направлении, как и в перевиваемых гепатомах мышей [1] и в первичных гепатомах, индуцированных ДЭНА (см. табл. 1). Весьма вероятно, что совпадение это не случайно и представляет собой один из механизмов ускоряющего действия диеты на выход гепатом при действии ААФ. Это, однако, требует дальнейшего анализа.

Представить экспериментальные данные у опытных групп животных в виде средних значений невозможно, так как канцерогенез протекает, по-видимому, у каждой крысы индивидуально. Поэтому мы предпочли для большей информативности привести отдельно данные по каждой исследованной крысе. В 3-й группе из 12 крыс выжили 9; из последних у 5 были обнаружены большие гепатомы, у 2 (№ 1 и 2) печень сохранила внешний нормальный вид, хотя и была вся в мелких узелках при разрезе. У этих крыс выявлена минимальная активность ГК из всей подопытной группы, практически отсутствовала связанная ГК, обнаружены довольно высокая активность ГЛК и ЦО и большое количество МХ. У крыс № 3 и 4 печень макроскопически была очень сильно изменена — все дольки содержали

множество крупных узелков, поверхность печени была бугристой. В печени этих животных активность ГК была увеличена в 5—7 раз и около 40% ее было прочно связано с мембранами МХ; кроме этого, у крысы № 3 отсутствовала ГЛК, а у крысы № 4 она была снижена в 2,7 раза. У обеих крыс активность ЦО была снижена в 1,8 раза. У 3 крыс с гепатомами была исследована также и оставшаяся часть печени, которая макроскопически была

Т а б л и ц а 1

Некоторые биохимические характеристики печени крыс до и после воздействия химических канцерогенов

Группа животных	№ крыс	Объект исследования	ГК			ГЛК	ЦО	Белок МХ, мг/г
			общая	растворимая	связанная			
1-я	—	Печень	0,10±0,04	0,10±0,04	0	0,62±0,10	2,7±0,3	60±5
2-я	1	»	0,08±0,03	0,08±0,03	0	0,28±0,07	1,5±0,5	50±5
	2	»	0,38	0,38	0	0,42	1,8	50±2
	3	»	0,24	0,20	0,04	0,56	1,8	46±1
	4	»	0,55	0,35	0,20	0,23	1,6	38±1
	5	»	0,72	0,37	0,30	0,02	1,4	29±1
	6	»	0,70	0,40	0,30	0	1,6	—
	7	»	0,48	0,30	0,18	0,18	0,8	—
3-я	8	Гепатома	1,35	0,70	0,65	0	0,5	—
	9	Печень	0,37	0,30	0,07	0,05	0,9	30±1
	10	Гепатома	0,77	0,44	0,33	0,02	0,7	23±1
	11	»	1,42	0,75	0,67	0	0,9	25±2
	12	»	1,12	0,75	0,37	0	1,0	29±2
	13	Печень	0,30	0,10	0,20	0,46	1,4	25
	14	»	0,76	0,72	0,04	0,28	1,3	21
	15	»	0,76	0,66	0,10	0,17	1,7	26
4-я	16	»	0,42	0,18	0,24	0,34	2,2	43
	17	»	0,82	0,70	0,12	—	1,7	33
	18	»	0,48	0,38	0,10	—	1,6	24
	19	»	0,23	0,21	0,02	0,31	1,3	26

Примечание. Активность ГК и ГЛК измеряли соответственно при концентрации глюкозы 1 и 100 мМ и выражали в мкмольх на 1 мг белка в 1 ч, активность ЦО — в Е на 1 мг белка за 1 мин.

Т а б л и ц а 2

Экстракция ГК из мембран МХ при помощи АТФ

Группа животных	№ крыс	Исследованный материал	Активность ГК, Е/0,1 млх15 мин			Экстрагируемость, %
			МХ до инкубации	МХ после инкубации	экстракт	
3-я	6	МХ гепатомы	0,232	0,210	0,198	95
»	7	МХ »	0,165	0,153	0,158	100
»	8	МХ »	0,134	0,123	0,125	100
»	9	МХ »	0,283	0,275	0,264	97
4-я	1	МХ печени	0,085	0,067	0,070	100
»	4	МХ »	0,072	0,070	0,069	99
3-я	4	МХ »	0,117	0,110	0,112	100

у них сильно поражена и не отличалась от печени животных № 1—4. Видно, что и по своим биохимическим характеристикам эти ткани близки друг другу, хотя у 2 крыс активность ЦО по сравнению с контролем была снижена в 3 раза.

Наиболее существенные изменения обнаруживались, однако, в самих индуцированных гепатомах. Видно (см. табл. 1), что в них полностью отсутствовала индуцибельная ГЛК, имеющая очень важное значение для фи-

зиологии печени и являющаяся одним из ее маркерных ферментов. В гепатомах ГЛК заменялась на конститутивную форму этого фермента — ГК, причем активность последней была повышена в 8—14 раз. Столь же резко была изменена и активность общей ЦО, которая была снижена в гепатомах в 2,7—5,4 раза; наблюдалось также резкое уменьшение количества белка МХ — в среднем в 2,3 раза. Однако самым существенным фактом является то, что в первичных гепатомах около 50% всей ГК было связано с мембранами МХ. Таким образом, клетки первичных гепатом по основным свойствам ключевого фермента утилизации углеводов приобретают свойства, присущие клеткам эмбриональной печени и различным другим тканям взрослых животных, а также клеткам перевиваемых гепатом: в них отсутствует ГЛК, очень высока активность ГК и значительная часть ее находится в связанном с МХ состоянии. Это свидетельствует о процессе биохимической дисдифференцировки гепатоцитов по данному признаку при малигнизации.

Опыты с ААФ, при котором индукция опухолей протекает медленнее, чем с ДЭНА, показывают, что активность изучаемых ферментов в ходе канцерогенеза сильно колеблется от животного к животному (см. табл. 1). Тем не менее при индивидуальном рассмотрении этих подопытных животных оказывается, что все изменения активности ферментов, количества белка МХ и гомогената, а также появление фракции ГК, связанной с МХ, протекают принципиально так же, как и в случае воздействия на печень более сильного канцерогена — ДЭНА. При этом, так же как и в опытах с ДЭНА, макроскопическая картина поражения печени крыс коррелирует с выраженностью ее биохимической дисдифференцировки.

Ранее было показано, что связанная с МХ гепатом ГК в отличие от связанной ГК эмбриональной печени плохо солибилизируется при действии АТФ и глюкозо-6-фосфата [7], которые легко экстрагируют всю ГК нормальных тканей, связанную с МХ. Это свойство связанной ГК в перевиваемых гепатомах представляется весьма важным, так как обратимый переход ГК из связанного состояния в растворимое под действием АТФ и глюкозо-6-фосфата рядом авторов считается одним из основных механизмов регуляции активности ГК в клетках, а следовательно, утилизации ими углеводов [5, 8]. В связи с этим представляло интерес проверить, как в этом отношении ведет себя ГК в первичных гепатомах крыс. Экстракцию ГК производили при инкубации суспензии МХ с 12,5 мМ АТФ. Из табл. 2 видно, что связанная ГК из МХ гепатом и печени практически полностью экстрагируется при однократной инкубации с АТФ, т. е. они в этом отношении не отличаются от эмбриональной печени [7]. Эти данные, по-видимому, позволяют заключить, что появление в перевиваемых гепатомах фонда связанной ГК, не извлекаемой посредством АТФ и глюкозо-6-фосфата, представляет собой следствие поздних этапов прогрессии. Приведенные данные, однако, не противоречат представлению о том, что сама возможность перевивки первичных индуцированных гепатом может оказаться связанной с рассматриваемым свойством ГК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гобеев В. Н. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 2150. — 2. Sy d o w G. — Acta biol. med. germ., 1967, Bd 18, S. K1-5. — 3. Anderson J. W., Herma n R. H., Tyrel J. B. et al. — Am. J. clin. Nutr., 1971, v. 24, p. 642. — 4. Sy d o w G. — Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1969, Bd 350, S. 263. — 5. Tuttle J. P., Wilson J. E. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 212, p. 185. — 6. Goa J. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1953, v. 5, p. 218. — 7. Гобеев В. Н., Хрипач Л. В. — Вопр. мед. химии, 1976, № 6, с. 798. — 8. Wilson J. E. — J. biol. Chem., 1968, v. 243, p. 3640.

Поступила 3/XI 1978 г.

ACTIVITY OF SOME KEY ENZYMES OF GLYCOLYSIS AND RESPIRATION IN RAT LIVER TISSUE IN CHEMICAL CARCINOGENESIS

V. N. Gobeev, T. T. Beresov

Chair of Biochemistry, P. Lumumba State University, Moscow

Activities of hexokinase, glucokinase, cytochrome oxidase as well as amount of mitochondrial protein and subcellular distribution of hexokinase were studied in rat liver tissue after administration of acetyl aminofluorene and diethyl nitrosamine. Activity of the enzymes was altered in the same direction both in the primary induced hepatomas and in transplantable tumors of liver tissue. Glucokinase was not found but the fraction of hexokinase bound to mitochondrial membranes was observed in all the primary hepatomas studied; in this property the tumors resembled the embryonal liver tissue, various tissues of mature animals and transplantable hepatomas. This pattern of distribution of the enzymes reflects biochemical and functional dis differentiation of the hepatomas. Properties of the bound hexokinase from the hepatoma were similar to those of the enzyme from embryonal liver tissue and, hence, they were distinct as compared with the enzymatic properties of hexokinase in the transplantable hepatomas.

УДК 616.127-092.9-07:616-008.93 4.586.3-074

Л. В. Розе, Е. Л. Розенфельд, И. А. Попова, А. М. Вихерт, К. Н. Быковская

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ГЛИКОГЕНА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АУТОИММУННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

У крыс с экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатией в сердечной мышце и печени в отличие от скелетных мышц имеются нарушения в обмене гликогена и его регуляции. При развитии патологического процесса содержание гликогена в сердце не изменяется по сравнению с нормой, при этом одновременно возрастает активность гликогенсинтетазы, фосфорилазы и кислой α -глюкозидазы. Введение адреналина, норадреналина и серотонина животным с экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатией не вызывает активации фосфорилазы в сердце, как это происходит в норме. Уровень гликогена в печени крыс с экспериментальной кардиомиопатией резко возрастает по сравнению с нормой. Введение биогенных аминов этим животным приводит к снижению концентрации гликогена в печени и повышению активности кислой α -глюкозидазы, не вызывая изменений активности фосфорилазы А и гликогенсинтетазы. В работе обсуждается возможность снижения аномально высокого содержания гликогена в печени крыс с указанной патологией при помощи биогенных аминов.

Об особенностях обмена гликогена при различных патологических процессах обычно судят по изменению его содержания и активности ферментов, участвующих в его синтезе и фосфоролизе [1, 2]. Между тем значительную роль в распаде гликогена в клетке играет не только фосфоролиз, но и γ -амилолиз этого полисахарида [3, 4].

Изучая превращения гликогена (как, впрочем, и других соединений в клетке), необходимо учитывать, что изменения активности того или иного фермента зависят не только от его каталитических свойств, но и от особенностей его регуляции [5]. Процессы регуляции обмена гликогена при различных заболеваниях сердца, в частности при кардиомиопатиях, почти не изучены. В связи с этим представляет интерес исследовать обмен гликогена и его регуляцию, а также роль γ -амилолиза гликогена на экспериментальной модели кардиомиопатии, воспроизведенной по методу А. М. Вихерта и соавт. [6].

Методика

Работа выполнена на крысах-гибридах (August \times Wistar), выведенных в отделе сердечно-сосудистой патологии человека Института кардиологии АМН СССР. Использованы самцы и самки 14-й генерации гибридных животных с первоначальной массой 200—250 г. Для воспроизведения аутоиммунной кардиомиопатии животных иммунизировали смесью β -гемолитических стрептококков с ядрами, выделенными из сердеч-

ной мышцы. Иммунизацию проводили двумя курсами инъекций с месячным интервалом. Крысы находились на стандартном кормовом рационе, воду получали без ограничения (автопоилки). В одной серии опытов график иммунизации был несколько изменен: месячный интервал между курсами был сокращен на неделю. Перед умерщвлением животных лишали корма на 17—18 ч, в воде не ограничивали. За 30 мин до декапитации им вводили подкожно растворы адреналина битартрата («Calbiochem», США), норадреналина гидротартрата (Украинский институт эндокринологии, Харьков) и серотонина креатинин-сульфата («Gee Lowson», Англия), приготовленных на 0,85% NaCl из расчета 0,46, 0,46 и 2,3 мкмоль на 200 г массы тела соответственно. Контрольные животные получали физиологический раствор в том же объеме. Из забитых животных быстро извлекали ткани, замораживали и хранили на сухом льду.

Гликоген из тканей выделяли, переосаждая полисахарид в 66% этаноле 3 раза после солюбилизации ткани в 30% горячем КОН [7]. Концентрацию гликогена определяли после его ферментативного гидролиза амилоглюкозидазой («Koch Light», Англия) [8], измеряя количество образующейся при этом глюкозы глюкозооксидазным методом [9].

Активность фосфорилазы определяли микрометодом [10], активность общей фосфорилазы — в присутствии 5'-АМФ («Reanal», Венгрия), активность фосфорилазы А — в отсутствие 5'-АМФ.

Активность гликогенсинтетазы измеряли по включению радиоактивной глюкозы, равномерно меченой ^{14}C , из УДФ- ^{14}C -глюкозы в гликоген, используя в качестве ферментного препарата 10% гомогенат сердечной мышцы и 20% гомогенат скелетных мышц, приготовленные по методу Томаса и соавт. [11], и 10% гомогенат печени, приготовленный по методу Голдена и соавт. [12]. Гомогенаты не центрифугировали, так как возможны потери фермента при осаждении [12]. Инкубационная проба состояла из 0,1 мл гомогената и 0,2 мл субстратной смеси, содержащей 50 мМ трис-HCl-буфер pH 7,8, 5 мМ ЭДТА, 1% гликоген, 13,4 мМ глюкозо-6-фосфат («Reanal», Венгрия) и УДФ- ^{14}C -глюкозу (284 мКи/ммоль, 115 000 имп/мин в пробе; фирма «Amersham», Англия) для сердечной мышцы и скелетных мышц и 50 мМ трис-HCl-буфер pH 7,5, 5 мМ ЭДТА, 1% гликоген, 6 мМ глюкозо-6-фосфат, УДФ- ^{14}C -глюкозу (30 000 имп/мин в пробе) для печени. Активность гликогенсинтетазы I определяли без глюкозо-6-фосфата, активность гликогенсинтетазы I+D — в его присутствии. После инкубации при 37°C реакцию останавливали, добавляя 1 мл 30% КОН и пробы кипятили на водяной бане в течение 10 мин. После трехкратного переосаждения гликогена в 66% этаноле (перед первым осаждением добавляли по 0,1 мл 10% Na_2SO_4) 0,7 мл водного раствора гликогена вносили в 10 мл сцинтилляционной жидкости Брея [13] и просчитывали на счетчике Mark II («Nuclear Chicago», США). В этих условиях концентрация субстрата была насыщающей и нарастание продукта реакции было прямо пропорционально во времени в течение 15 мин.

Активность кислой α -глюкозидазы (γ -амилазы) определяли в частично очищенном препарате фермента по скорости образования глюкозы из гликогена. Ткани гомогенизировали на холоду с двумя объемами 25 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА pH 6,9 и оставляли при комнатной температуре для экстракции, затем центрифугировали 20 мин при 7000 об/мин также при комнатной температуре. Надосадочную жидкость доводили 0,5 М CH_3COOH до pH 4,8, прогревали при 60°C в течение 20 мин и снова центрифугировали 10 мин при 7000 об/мин. Полученный супернатант использовали в качестве ферментного препарата. Пробы, содержащие 0,1 мл частично очищенного препарата кислой α -глюкозидазы и 0,1 мл раствора гликогена (30 мг/мл, приготовленного на 0,1 М ацетатном буфере pH 4,8, содержащем 1 мМ ЭДТА), инкубировали при 37°C. Реакцию останавливали, добавляя 0,4 мл 0,3 н. NaOH и 0,4 мл 5% ZnSO_4 . В надосадочной жидкости определяли содержание глюкозы глюкозооксидазным методом [9]. Количество белка рассчитывали методом Лоури и соавт. [14]. Об активности амило-1,6-глюкозидазы судили по скорости образования глюкозы при расщеплении фосфорилазного ф-лимитдекстрина гликогена, согласно микрометоду Херса [10]. ф-Лимитдекстрин получали при исчерпывающем расщеплении гликогена с помощью фосфорилазы Б [15], выделенной из скелетных мышц кролика по методу Фишера и Кребса [16]. Глюкозу определяли глюкозооксидазным методом. Активность моноаминоксидазы устанавливали с помощью метода, описанного В. З. Горкиным и соавт. [17]. Инкубационная проба содержала 0,1 мл 50% гомогената печени, приготовленного на охлажденном 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 2% тритон X-100 и раствор субстрата на том же буфере (10 мкмоль серотонина креатинин-сульфата на пробу или 0,6 мкмоль отечественного препарата β -фенилэтиламина) в конечном объеме 1,8 мл. Определение аммиака, образующегося в результате реакции, проводили по методу Конвея с последующей несслеризацией. Активность моноаминоксидазы выражали в микромолях NH_3 , образующегося за 1 мин на 1 мг белка. Уровень белка в гомогенате измеряли модифицированным методом Лоури, пригодным для выявления мембраносвязанных белков в присутствии мешающих определению соединений, согласно Петерсон [18]. Определение максимума поглощения комплекса гликогена с йодом по методу Крисман проводили, как описано ранее [3]. Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики [19].

Результаты и обсуждение

Сердечная мышца. В сердечной мышце крыс при иммунизации содержание гликогена существенно не меняется (табл. 1). У иммунизированных животных несколько повышается активность общей гликогенсинтетазы, в основном за счет увеличения активности I-формы фермента. Одновременно возрастает активность фосфорилазы за счет значительного роста активности формы А. Несколько повышается и активность кислой α -глюкозидазы, осуществляющей гидролиз гликогена в лизосомах. Активность фермента, расщепляющего связи ветвления в молекуле гликогена (амило-1,6-глюкозидазы), практически не изменяется. Ранее нами установлено, что введение норадреналина вело к снижению содержания гликогена в сердечной мышце, а введение серотонина — к его повышению. При этом применение норадреналина снижало активность гликогенсинтетазы (общей и формы I), а введение серотонина — активность только I-формы фермента. В этих опытах при введении обоих аминов происходила активация фосфорилазы А, а активность кислой α -глюкозидазы уменьшалась только после использования норадреналина и не менялась при введении серотонина. Иная картина наблюдалась у иммунизированных животных при применении биогенных аминов. При их введении содержание гликогена в сердечной мышце практически не изменялось, не отмечено и активации фосфорилазы А. Активность кислой α -глюкозидазы при введении норадреналина не снижалась. Действие аминов на гликогенсинтетазу оставалось таким же, как и у неиммунизированных животных, за исключением того, что при введении серотонина снижалась активность как формы I, так и общей гликогенсинтетазы.

Печень. В печени крыс с экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатией обнаружены значительные изменения обмена гликогена и его регуляции по сравнению с нормой. У иммунизированных животных резко возрастало содержание гликогена в печени: у животных 1-й группы — в 40 раз, у животных 2-й группы — в 10 раз, а при измененном графике иммунизации — вдвое (табл. 2). Максимум спектра поглощения комплекса гликогена с йодом, выявленный при анализе гликогенов печени иммунизированных животных, не отличался от нормы и был равен 465 нм, что указывало на сохранение нормальной структуры полисахарида. Активность гликогенсинтетазы (как общей, так и формы I) несколько снижалась, что могло быть следствием высокого уровня гликогена в печени животных, тормозящего активность фермента [20]. Активность фосфорилазы, кислой α -глюкозидазы и амило-1,6-глюкозидазы при иммунизации не изменялась. Между показателями активности ферментов и в тенденции их изменения при введении аминов не выявлены резкие различия по 3 группам животных, как это наблюдалось в содержании гликогена, поэтому лишь концентрации гликогена даны отдельно для каждой группы. Высокий уровень гликогена в печени иммунизированных животных, вероятно, мог быть следствием различной чувствительности к голоданию иммунизированных и неиммунизированных животных. У неиммунизированных крыс гликоген печени при голодании практически исчезает (снижение от $52,7 \pm 1,7$ до $0,81 \pm 0,10$ мг/г). Между тем при иммунизации голодание не приводило к такому резкому снижению содержания гликогена: оно было от $40,1 \pm 2,9$ до $34,3 \pm 2,1$ мг/г у животных 1-й группы до $7,9 \pm 0,9$ мг/г у животных 2-й группы и до $1,8 \pm 0,2$ мг/г у животных 3-й группы.

Несмотря на то что при введении аминов иммунизированным животным, так же как и в норме, наблюдалось снижение содержания гликогена и активность гликогенсинтетазы не менялась, введение аминов выявляло нарушения в регуляции как фосфоролиза, так и γ -амилолиза гликогена. У неиммунизированных животных активность фосфорилазы А при введении аминов возрастала, а у иммунизированных оставалась без изменений и даже снижалась при введении норадреналина. Активность кислой α -глюкозидазы, наоборот, повышалась при введении всех аминов, в то время как у

Таблица 1

Содержание гликогена и активность ферментов обмена гликогена в сердце крыс ($M \pm m$)

Показатель	Неиммунизированные крысы	Иммунизированные крысы			
		контрольные	получавшие адреналин	получавшие норадреналин	получавшие серотонин
Гликоген	$2,9 \pm 0,6$ (5)	$2,1 \pm 0,3$ (5)	$2,2 \pm 0,2$ (5)	$1,9 \pm 0,6$ (4)	$2,1 \pm 0,4$ (4)
Гликогенсинтетаза:					
I + D	$106,3 \pm 10,2$ (7)	$129,8 \pm 4,1$ (8)	$111,6 \pm 6,4^*$ (8) $P < 0,05$	$86,2 \pm 8,2$ (6) $P < 0,01$	$106,6 \pm 4,7^*$ (5) $P < 0,01$
I	$75,1 \pm 9,0$ (7)	$101,3 \pm 3,3^*$ (8) $P < 0,05$	$85,2 \pm 5,7^*$ (8) $P < 0,05$	$67,1 \pm 5,4^*$ (6) $P < 0,01$	$76,0 \pm 2,9^*$ (5) $P < 0,05$
Фосфорилаза:					
A + B	$43,7 \pm 10,6$ (5)	$59,9 \pm 5,8$ (6)	$61,4 \pm 6,6$ (8)	$47,2 \pm 6,9$ (5)	$47,7 \pm 11,3$ (5)
A	$11,0 \pm 1,8$ (6)	$20,3 \pm 2,2^*$ (6) $P < 0,05$	$21,3 \pm 2,6$ (6) $3,2 \pm 0,6$ (6)	$17,6 \pm 2,5$ (6) $3,4 \pm 0,2$ (6)	$28,1 \pm 2,6$ (6) $2,9 \pm 0,5$ (5)
Кислая α -глюкозидаза	$2,7 \pm 0,2$ (11)	$3,5 \pm 0,3^*$ (8) $P < 0,05$	$0,22 \pm 0,06$ (5)	$0,24 \pm 0,08$ (4)	$0,22 \pm 0,05$ (4)
Амило-1,6-глюкозидаза	$0,21 \pm 0,03$ (5)	$0,21 \pm 0,05$ (5)			

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 — концентрация гликогена — в мг на 1 г ткани, активность ферментов: гликогенсинтетазы — в мкмольях меченой глюкозы, присоединившейся за 1 мин, на 1 г ткани, фосфорилазы — в мкмольях неорганического фосфора, освободившегося за 1 мин, на 1 г ткани, кислой α -глюкозидазы — в мкмольях глюкозы, освободившейся за 1 мин, на 1 мг белка $\times 10^3$, амило-1,6-глюкозидазы — в мкмольях глюкозы, освободившейся за 1 мин, на 1 г ткани; в скобках — число животных; звездочка — достоверно различающиеся результаты.

Содержание гликогена, активность ферментов обмена гликогена и моноаминоксидазы в печени крыс ($M \pm m$)

Показатель	Неиммунизированные крысы	Иммунизированные крысы			
		контрольные	получавшие адреналин	получавшие норадреналин	получавшие серотонин
Гликоген	$0,8 \pm 0,1$ (9)	I) $34,3 \pm 2,1^*$ (2) $P < 0,01$ II) $7,9 \pm 0,9^*$ (6) $P < 0,01$ III) $1,8 \pm 0,2^*$ (5) $P < 0,01$	I) $11,1 \pm 2,3^*$ (3) $P < 0,01$	I) $15,7 \pm 5,2^*$ (4) $P < 0,01$	I) $13,2 \pm 3,8^*$ (3) $P < 0,01$
Гликогенсинтетаза: I + D	$23,3 \pm 1,6$ (8)	$17,2 \pm 1,8^*$ (7) $P < 0,05$	$23,3 \pm 4,7$ (5)	$20,2 \pm 2,0$ (5)	$21,3 \pm 2,4$ (5)
I	$12,3 \pm 1,1$ (8)	$8,3 \pm 1,0^*$ (7) $P < 0,05$	$9,6 \pm 1,8$ (5)	$8,9 \pm 1,7$ (5)	$10,9 \pm 1,2$ (5)
Фосфоорилаза: A + B	$31,5 \pm 2,6$ (7)	$32,7 \pm 2,9$ (8)	$30,8 \pm 2,4$ (8)	$22,7 \pm 2,9^*$ (6) $P < 0,05$	$29,0 \pm 1,9$ (6)
A	$20,4 \pm 2,9$ (7)	$20,0 \pm 3,3$ (8)	$19,0 \pm 2,7$ (8)	$14,0 \pm 1,0$ (6)	$18,5 \pm 2,9$ (6)
Кислая α -глюкозидаза	$4,1 \pm 0,1$ (10)	$4,1 \pm 0,3$ (9)	$6,0 \pm 0,3^*$ (7) $P < 0,01$	$5,6 \pm 0,3^*$ (6) $P < 0,01$	$6,1 \pm 0,6^*$ (5) $P < 0,05$
Амил-1,6-глюкозидаза	$0,42 \pm 0,02$ (5)	$0,42 \pm 0,03$ (6)	$0,37 \pm 0,04$ (5)	$0,40 \pm 0,02$ (4)	$0,43 \pm 0,01$ (4)
Моноаминоксидаза: по серотонину	I) $13,0 \pm 0,07$ (2)	I) $9,4 \pm 0,1^*$ (2) $P < 0,01$	—	—	—
	II) $10,0 \pm 0,2$ (4)	II) $7,6 \pm 0,6^*$ (4) $P < 0,01$	—	—	—
по β -фенилэтиламину	I) $3,4 \pm 0,3$ (2)	I) $1,6 \pm 0,1^*$ (2) $P < 0,01$	—	—	—
	II) $2,0 \pm 0,2$ (3)	II) $1,5 \pm 0,2^*$ (3) $P < 0,05$	—	—	—

П р и м е ч а н и е. I, II — группы иммунизированных животных, забитых в разное время; III — группа с измененным графиком иммунизации; активность мснсаминсксидазы — в микрсмслях NH_3 , сбразукшегося за 1 мин, на 1 мг белка.

неиммунизированных животных она уменьшалась после применения норадреналина и не менялась при использовании серотонина.

Скелетные мышцы. В скелетных мышцах иммунизированных животных не происходило существенных изменений содержания гликогена и активности исследованных ферментов (лишь снижалась активность фосфорилазы А, что связано, возможно, с меньшей подвижностью иммунизированных животных). Введение аминов приводило к тем же сдвигам активности ферментов и содержания гликогена, как и в норме (табл. 3).

Как видно из приведенных выше данных, развитие экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатии сопровождается одновременным усилением в сердечной мышце как синтеза, так и распада гликогена, причем активируются оба пути распада — фосфоролит и гидролиз. Вследствие активации синтеза и распада гликогена содержание последнего при иммунизации не изменяется. По-видимому, в сердечной мышце создаются условия, когда возрастает роль анаэробных процессов образования энергии. При экспериментальной алкогольной кардиомиопатии также не отмечено изменений в содержании гликогена в сердце [21, 22]. Введение аминов не приводит к дальнейшему повышению активности фосфорилазы, как это характерно для неиммунизированных животных. Поскольку у иммунизированных животных активность фосфорилазы А повышена по сравнению с нормой, то, вероятно, активность данного фермента уже достигла своего порогового значения и активирующее действие биогенных аминов при этом не обнаруживается. Ранее нами установлено, что в сердце крысы при увеличении активности общей фосфорилазы и фосфорилазы А в результате действия анестезирующих веществ (нембутала и эфира) адреналин и норадреналин не способны более стимулировать переход фосфорилазы из неактивной формы в активную [23]. Аналогичная картина выявлена при изучении активности тирозингидроксилазы в сердце хомячков при кардиомиопатии: обработка резерпином не вызывала

Т а б л и ц а 3
Содержание гликогена и активность ферментов обмена гликогена в скелетных мышцах крыс ($M \pm m$)

Показатель	Неиммунизированные крысы	Иммунизированные крысы			
		контрольные	получавшие адреналин	получавшие норадреналин	получавшие серотонин
Гликоген	$3,4 \pm 0,8$ (4)	$3,6 \pm 0,6$ (5)	$2,1 \pm 0,4^*$ (4) $P < 0,05$	$2,9 \pm 0,4$ (5)	$3,2 \pm 0,7$ (4)
Гликогенсинтетаза:					
I + D	$247,3 \pm 11,2$ (8)	$220,4 \pm 23,1$ (7)	$263,2 \pm 23,5$ (6)	$248,9 \pm 30,0$ (5)	$275,4 \pm 37,1$ (5)
I	$190,1 \pm 12,0$ (8)	$147,1 \pm 19,0$ (7)	$153,1 \pm 30,8$ (5)	$200,1 \pm 28,5$ (5)	$181,9 \pm 30,7$ (4)
Фосфорилаза:					
A + B	$171,0 \pm 17,2$ (7)	$176,0 \pm 9,9$ (8)	$230,0 \pm 16,6^*$ (8) $P < 0,05$	$199,7 \pm 12,6$ (6)	$231,8 \pm 21,6^*$ (6)
A	$40,1 \pm 6,9$ (7)	$22,0 \pm 2,5^*$ (7) $P < 0,05$	$148,9 \pm 18,2^*$ (7) $P < 0,001$	$38,8 \pm 7,3^*$ (5) $P < 0,05$	$50,0 \pm 9,0^*$ (5) $P < 0,05$
Кислая α -глюкоксидаза	$1,9 \pm 0,1$ (8)	$2,4 \pm 0,2$ (9)	$2,2 \pm 0,1$ (7)	$2,9 \pm 0,4$ (5)	$2,1 \pm 0,2$ (5)
Амил-1,6-глюкозидаза	$0,19 \pm 0,02$ (5)	$0,17 \pm 0,02$ (6)	$0,16 \pm 0,02$ (5)	$0,13 \pm 0,01$ (5)	$0,13 \pm 0,01$ (5)

дальнейшего увеличения в гипертрофированном миокарде активности данного фермента, так как активность тирозингидроксилазы [была повышена по сравнению с нормой [24].

Аномально высокое содержание гликогена в печени иммунизированных животных при введении аминов снижается. Этот факт нельзя объяснить усилением фосфоролиза гликогена, так как активность фосфорилазы не изменяется при введении адреналина и серотонина и даже уменьшается при введении норадреналина. Активность гликогенсинтетазы в этих условиях также практически не меняется. По-видимому, сокращение содержания гликогена печени связано с активацией гидролитического пути распада полисахарида, так как при введении всех аминов возрастает активность кислой α -глюкозидазы. В связи с тем что кислая α -глюкозидаза является лизосомальным ферментом, такое резкое снижение уровня гликогена под действием аминов приводит к предположению, что оно связано с распадом лизосомального гликогена, количество которого в норме не превышает 10% от общего содержания гликогена в клетке [25], а у иммунизированных животных, по-видимому, резко повышено.

В предыдущих работах установлено, что в условиях торможения реакции окислительного дезаминирования в печени крыс, вызванного введением им ингибиторов моноаминоксидазы (паргилина и ипразида), биогенные амины (адреналин, норадреналин и триптамин) активируют кислую α -глюкозидазу [26]. В этих условиях в печени также не наблюдается активирующего действия адреналина и норадреналина на фосфорилазу в отличие от контроля. Возникает вопрос, не связано ли повышение активности кислой α -глюкозидазы в печени иммунизированных крыс при введении исследованных аминов с торможением активности моноаминоксидазы. Как видно из данных табл. 2, активность ее, исследованная по способности дезаминировать 2 субстрата — серотонин и β -фенилэтиламин, снижается приблизительно на 30%. Более резкое уменьшение активности моноаминоксидазы по β -фенилэтилмину (на 52%) отмечено у животных 1-й группы, у которых накопление гликогена было самым высоким.

Таким образом, в настоящей работе подтверждаются ранее полученные данные о том, что в регуляции обмена гликогена участвует не только цАМФ [27], но и биогенные амины и, возможно, продукты их превращений. Введение аминов животным с экспериментальной кардиомиопатией приводит к возрастанию гидролитического распада гликогена в печени, что может препятствовать аномальному накоплению гликогена в этом органе при указанной патологии.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук И. В. Веревкиной за полезные советы и помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Seroude J., Mulvaney D. L. — Fed. Proc., 1978, v. 37, p. 224. — 2. Miller T. B., Jr. — Am. J. Physiol., 1978, v. 231, p. E13—E19. — 3. Розенфельд Е. Л., Попова И. А., Орлова В. С. — Биохимия, 1970, т. 35, № 2, с. 356—365. — 4. Акопян А. С., Попова И. А., Промыслов М. Ш. и др. — Вopr. мед. химии, 1977, № 2, с. 237—261. — 5. Galton D. J., Beteridge D. J. — Molec. Aspects Med., 1977, v. 1, p. 307—402. — 6. Вихерт А. М., Быковская К. Н., Рыфф И. М. — Кардиология, 1977, № 4, с. 126—132. — 7. Good C. A., Kramer H., Somogyi M. — J. biol. Chem., 1933, v. 100, p. 485. — 8. Abdullah M., Fleming J. D., Taylor P. M. et al. — Biochem. J., 1963, v. 89, p. 35P. — 9. Лукомская И. С., Городенский В. К. — Биохимия, 1961, т. 26, с. 477. — 10. Hers H.-G. — In: Advances in Metabolic Disorders. New York, 1964, v. 101. — 11. Thomas J. A., Schlenker K. K., Larner J. — Analyt. Biochem., 1968, v. 25, p. 486. — 12. Golden S., Wals P. A., Katz J. — Ibid., 1977, v. 77, p. 436. — 13. Bray G. A. — Ibid., 1960, v. 1, p. 279. — 14. Lowry O. H., Rosebrough W. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265. — 15. Hers H.-G., Verhulst W., Van Hoff F. — Europ. J. Biochem., 1967, v. 2, p. 257. — 16. Fischer E. H., Krebs E. G. T. Meth. Enzymol., 1962, v. 5, p. 369. — 17. Горкин В. З., Ве-

ревкина И. В., Гриднева Л. И. и др. — В кн.: Современные методы в биохимии, М., 1968, т. 2, с. 155—177. — 18. Peterson G. L. — *Analyt. Biochem.*, 1977, v. 83, p. 346—356. — 19. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Л., 1975. — 20. Ruman B. E., Whelan W. J. — *Advanc. Enzymol.*, 1971, v. 34, p. 286—417. — 21. Alexander C. S., Forsyth G. W., Nagasawa H. T. et al. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1977, v. 9, p. 235—245. — 22. Alexander C. S., Sekhri K. K., Nagasawa H. T. — *Ibid.*, p. 247—254. — 23. Розе Л. В., Розенфельд Е. Л. — *Вопр. мед. химии*, 1978, № 5, с. 690—693. — 24. Sole M. J., Wurtman R. J., Chi Man Z. et al. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1977, v. 9, p. 225—233. — 25. Geddes R., Stratton G. C. — *Biochem. J.*, 1977, v. 163, p. 193—200. — 26. Орлова В. С., Синюхин В. Н., Попова И. А. и др. — *Биохимия*, 1971, т. 36, № 3, с. 555—561. — 27. Langer J. — *Circulat. Res.*, 1976, v. 38, N 5, Suppl. 1, p. 2—7.

Поступила 13/XI 1978 г.

PATTERNS OF REGULATION OF GLYCOGEN METABOLISM IN RATS WITH EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE CARDIOMYOPATHY

L. V. Rose, E. L. Rosenfeld, I. A. Popova, A. M. Vikhert, K. N. Bykovskaya

Institute of Biological and Medical Chemistry, All-Union Cardiological Research Centre
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow.

Alterations in glycogen metabolism and in its regulation were found in heart muscle and liver tissue, but not in skeletal muscle, of rats with experimental autoimmune cardiomyopathy. In development of the pathological process content of glycogen was unaltered in heart muscle as compared with the normal state; at the same time, activities of glycogen synthetase, phosphorylase and acid α -glucosidase were increased. After administration of adrenaline, noradrenaline and serotonin into animals with the cardiomyopathy, the phosphorylase from heart muscle was not activated, contrary to the response of the enzyme under normal conditions. Content of glycogen was drastically increased in liver tissue of rats with experimental cardiomyopathy, as compared with the normal state. Administration of biogenic amines into the animals led to a decrease in concentration of glycogen in liver tissue and to increase in activity of acid α -glucosidase, but did not affect the activities of phosphorylase A and glycogen synthetase. A possibility is considered for a decrease of the abnormally high content of glycogen in liver tissue of the impaired rats using treatment with biogenic amines.

УДК 576.851.232.098.31:577.152.411

С. С. Раков, В. Н. Федосеева, И. И. Вотрин

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕПАТОГЕННЫХ НЕЙССЕРИЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ГИСТИДИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

Лаборатория энзимологии и аллергологии АМН СССР, Москва

В клетках непатогенных нейссерий, выделенных из бронхов больных инфекционной астмой, гистидиндекарбоксилаза не обнаруживается. Отсутствие гистидиндекарбоксилазной активности свидетельствует о том, что сенсibilизирующее действие нейссерияльных клеток не определяется механизмом прямого воздействия гистамина бактериального происхождения на ткани бронхолегочного аппарата человека.

Ранее было показано, что непатогенные штаммы нейссерий (*Neisseria flava*, *Neisseria sicca*) обладают высокой сенсibilизирующей активностью и способны провоцировать выраженный бронхоспазм у животных в эксперименте [1]. Механизм сенсibilизирующего действия непатогенных нейссерий на ткани бронхолегочного аппарата до сих пор не изучен. Можно предполагать, что участие нейссерияльных клеток в процессах сенсibilизации макроорганизма определяется их гистидиндекарбоксилазной активностью с последующим образованием гистамина — медиатора аллергических реакций.

В настоящей работе предпринята попытка выявить гистидиндекарбоксилазную активность в клетках непатогенных нейссерий, выделенных из бронхов больных инфекционной астмой. Были использованы штаммы нейс-

серий № 3, 30, 53, 63 [2, 3]. Штаммы № 3 и 53 отличались способностью гемолизовать эритроциты кролика при росте на питательных средах, сбраживать глюкозу, мальтозу, сахарозу, фруктозу; они были идентифицированы как *Neisseria flava*. Штаммы № 30 и 63 не гемолизировали эритроциты, обладали выраженной сахаролитической активностью по отношению к глюкозе, мальтозе, сахарозе, фруктозе и характеризовались образованием колоний «сухого» типа; они были идентифицированы как *Neisseria sicca* [4]

Методы

Бактерии хранили на косяках с мясо-пептонным агаром (МПА) и кроличьей кровью. Выращивание проводили на твердых и жидких средах следующего состава: 1) МПА, содержащий 3—5% крови кролика; 2) мясо-пептонный бульон (МПБ) — мясная вода (250 мл), пептон (10 г), NaCl (5 г), K_2HPO_4 (2 г), глюкоза (5 г), вода (до 1 л); 3) полусинтетическая среда: мясная вода (250 мл), гистидин (2 г), ацетат натрия (5 г), глюкоза (5 г), K_2HPO_4 (10 г), KH_2PO_4 (1 г), вода (до 1 л); 4) синтетическая среда № 1: Арг (110 мг), Вал (110 мг), Про (110 мг), Цис (110 мг), Три (100 мг), Гли (40 мг), Сер (50 мг), Тре (60 мг), Фен (85 мг), Асп (65 мг), Гис (1 г), KCl (1 г), ацетат натрия (5 г), никотинамид (10 мг), биотин (10 мг), $MgSO_4$ (20 мг), $MnCl_2$ (2 мг),

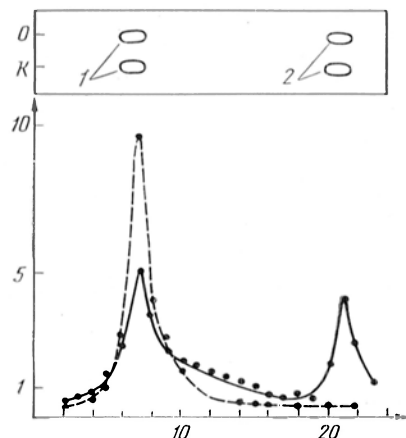


Рис. 1. Хроматографическое определение ^{14}C -гистамина как продукта реакции декарбоксилирования ^{14}C -гистидина декарбоксилазой из *Micrococcus* sp. n.

По оси абсцисс — фракции; по оси ординат — радиоактивность (в имп/мин $\cdot 10^3$). Вверху — 1 — гистидин, 2 — гистамин, О — опыт, К — контроль.

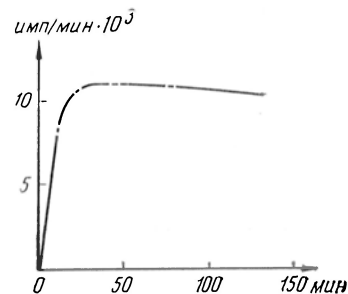


Рис. 2. Зависимость накопления ^{14}C -гистамина от времени инкубации.

По оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — количество ^{14}C -гистамина (в имп/мин $\times 10^3$).

$CaCl_2$ (2 мг), NaCl (2 мг), $FeCl_3$ (1 мг), глюкоза (20 г), K_2HPO_4 (50 мг), вода (до 1 л); 5) синтетическая среда № 2: Гис (1 г), $MgSO_4$ (20 мг), $MnCl_2$ (2 мг), $CaCl_2$ (2 мг), NaCl (2 мг), $FeCl_3$ (1 мг), K_2HPO_4 (500 мг), KH_2PO_4 (50 мг), вода (до 1 л).

Микроорганизмы выращивали на МПА при 37°C в течение 3—5 сут. При культивировании на жидких питательных средах контроль за ростом бактерий осуществляли фотокolorиметрически и клетки собирали в конце логарифмической фазы роста. С твердой культуральной среды клетки смывали 0,2 М фосфатным буфером pH 5,6, 7,3 или 9,4. При выращивании на жидких питательных средах бактерии собирали центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин и дважды отмывали от среды тем же буфером.

Активность гистидиндекарбоксилазы (ГДК) определяли в интактных, разрушенных толуолом и с помощью ультразвукового дезинтегратора (УЗДН1) клетках манометрическим методом [5] и путем определения радиоактивного гистамина. Разработанный нами метод определения активности ГДК основан на использовании в качестве субстрата 2- ^{14}C -гистидина (фирма «Calatonic») с удельной радиоактивностью 20 мкКи/мг. Для разработки метода использовали гомогенный препарат (ГДК) из *Micrococcus* sp. n. Инкубационные пробы содержали 10 мкл раствора ГДК (0,3 мкг) и 10 мкл раствора, содержащего 10 мкг (0,2 мКи) ^{14}C -гистидина. Инкубацию проводили в 0,2 М фосфатном буфере pH 5,6, 7,3 или 9,4 при 37°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали нагреванием инкубационных проб до 100°C в течение 1 мин, после чего их центрифугировали при 6000 g в течение 5 мин. Состав контрольных

проб был таким же, как и в опыте, но раствор фермента предварительно нагревали до 100°C в течение 1 мин. Из инкубационных проб отбирали аликвоты и наносили их на бумагу для хроматографии (ватман № 1). Одновременно в качестве внутреннего свидетеля на хроматограмму наносили гистамин (фирмы «Serva») в количестве 10—20 мкг на одну пробу. Продукты реакции разделяли с помощью хроматографии на бумаге в системе н-пропанол — 0,2 н. аммиак (3 : 1). Хроматографию проводили в течение 12 ч, хроматограммы проявляли нингидрин-кадмиевым реактивом. R_f для гистидина и гистамина были равны соответственно 0,271 и 0,649. Распределение ^{14}C -гистидина и ^{14}C -гистамина на хроматограмме определяли, разрезая ее на полоски шириной 1 см; разрезать начинали от стартовой линии. Полоски соответствующих фракций помещали в стаканы для сцинтилляции с 5 мл сцинтилляционной жидкости (FPO — 4 г, POFOP — 250 мг, толуол для сцинтилляции — до 1 л) и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике фирмы «Нуклеар Чикаго» (рис. 1). Для определения оптимальных условий реакции декарбоксилирования ^{14}C -гистидина исследовали кинетическую зависимость накопления продуктов реакции (^{14}C -гистамина) в присутствии ГДК из *Micrococcus* sp. n. (рис. 2). Удельную радиоактивность ГДК выражали в международных единицах активности. Значения удельной активности ГДК из *Micrococcus* sp. n., определенные этим методом, соответствовали ее значениям, полученным манометрическим методом (порядка 30 МЕ). Однако радиометрический метод оказался в 10 000 раз чувствительнее: с его помощью можно количественно определить $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{14}\text{C}$ -гистамина. Радиометрическим методом определяли активность ГДК интактных клеток *Micrococcus* sp. n. В этом случае наблюдалась полная корреляция между значениями удельной радиоактивности ГДК, полученными радиометрическим и манометрическим методами.

При определении активности ГДК в клетках нейссерий манометрическим методом состав инкубационных проб был следующим: 2,5 мл суспензии клеток (0,4—0,5 мг белка) и 0,5 мл раствора гистидина (25 мкмоль). Инкубацию проводили в 0,2 М фосфатном буфере pH 5,6, 7,5 или 9,4 при 37°C в течение 10—360 мин.

Результаты

При изучении клеток нейссерий, выращенных на питательных средах 1—4, ни в одном из этой серии опытов не удалось обнаружить образования CO_2 в результате декарбоксилирования гистидина. Исследование активности ГДК в клетках нейссерий радиометрическим методом проводили в тех же условиях, что и манометрически. После проявления хроматограмм в пятнах, соответствующих внутреннему свидетелю (гистамину), была обнаружена следовая радиоактивность, которая не превышала радиоактивность контрольных проб.

Известно, что для большинства декарбоксилаз микроорганизмов пиридоксальфосфат является кофактором. Поэтому в следующем ряде экспериментов клетки нейссерий, выращенные на питательных средах 1—4, преинкубировали с пиридоксальфосфатом (от 1 до 50 мкг на инкубационную пробу) в течение 2—12 ч. Преинкубацию с пиридоксальфосфатом проводили и с разрушенными клетками. Ферментативную активность определяли радиометрическим методом. Радиоактивность пятен внутреннего свидетеля оказалась на уровне контрольных проб.

Была предпринята попытка индуцировать биосинтез ГДК в клетках нейссерий. Для этого бактерии выращивали на культуральной среде 5, содержащей в качестве источника углерода и азота лишь гистидин; после этого определяли активность ГДК, как описано выше. И в этом случае клетки нейссерий не обладали гистидиндекарбоксилазной активностью.

Отсутствие у непатогенных нейссерий гистидиндекарбоксилазной активности, возможно, указывает на то, что сенсibiliзирующая активность нейссерияльных клеток не определяется механизмом прямого воздействия гистамина бактериального происхождения на ткани бронхолегочного аппарата человека.

Литература

1. Адо А. Д., Андрианова Н. В., Довисин В. П. и др. — Сов. мед., 1968, № 9, с. 12. — 2. Адо А. Д., Андрианова Н. В., Федосеева В. Н. — В кн.: Этиология, патогенез, клиника и лечение заболеваний органов дыхания. Л., 1970, с. 3. — 3. Адо А. Д., Федосеева В. Н., Авдеева Т. А. и др. — Бюлл. exper. биол., 1977, № 8, с. 13. — 4. Ковалева В. В., Андрианова

ABSENCE OF THE HISTIDINE DECARBOXYLASE IN NONPATHOGENIC NEISSERIA FLAVA, SICCA

S. S. Rakov, V. N. Fedoseeva, I. I. Voltrin

Laboratory of Enzymology, Laboratory of Allergology, Academy of Medical Science of the USSR, Moscow

Histidine decarboxylase activity was not found in cells of nonpathogenic neisseria, obtained from bronchi of patients with infectious asthma. The absence of the histidine decarboxylase activity in nonpathogenic neisseria cells suggests that the sensitizing activity of these cells was not caused by a direct effect of histamine of bacterial origin on human bronchopulmonary tissues.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.153.962.5+616.153.1:577.152.344-074.543.42.062

В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина

УНИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ α_1 -АНТИТРИПСИНА И α_2 -МАКРОГЛОБУЛИНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Предложен модифицированный спектрофотометрический метод одновременного определения уровня α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ) и α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) в сыворотке (плазме) крови человека, основанный на различном механизме взаимодействия указанных ингибиторов с трипсином при использовании низкомолекулярного субстрата — *N*- α -бензоил-L-аргинин этилового эфира. Активность α_1 -АТ определяли по торможению аргинин-эстеразной активности трипсина, разведенной в 50 раз сывороткой крови человека; α_2 -МГ измеряли по сохраняющейся аргинин-эстеразной активности комплекса трипсин — α_2 -макроглобулин, образующегося после взаимодействия избытка трипсина с сывороткой крови, разведенной в 10 раз, и последующей инактивации свободного, не связанного с α_2 -МГ трипсина соевым ингибитором трипсина. Приводятся результаты определения уровня α_1 -АТ и α_2 -МГ данным методом в сыворотке крови здоровых людей, больных ожоговой болезнью и раком поджелудочной железы. Метод позволяет быстро и специфично определять в малом объеме сыворотки крови (0,1 мл) два главных ингибитора протеиназ плазмы крови с использованием одного недефицитного коммерческого препарата субстрата, метод может быть рекомендован для рутинных клинических исследований.

Природные ингибиторы протеиназ, присутствующие в плазме крови, интенсивно изучаются в последние годы. Интерес к ним обусловлен теми разнообразными и важными функциями, которые они выполняют в организме как регуляторы таких сложных взаимосвязанных ферментных систем, как система свертывания крови, фибринолиза, кининовая система, система комплемента, а также как факторы защиты от инфекции [1, 2].

Уровень двух главных ингибиторов протеиназ плазмы крови — α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ) и α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) — определяют иммунохи-

мическими или энзиматическими методами. Энзиматические методы основаны на торможении расщепления трипсином белковых и низкомолекулярных субстратов N- α -бензоил-L-аргинин-паранитроанилида (БАПНА), N- α -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ) и N- α -тозил-L-аргинин-метилового эфира (ТАМЕ). Применение последних позволяет отдельно определять содержание α_1 -АТ и α_2 -МГ за счет различных механизмов взаимодействия указанных ингибиторов с трипсином и комплексов трипсин—ингибитор с субстратом. Широко распространенные в нашей клинической практике модифицированные методы определения общей антитриптической активности сыворотки крови с использованием БАПНА [3] или БАЭЭ [4, 5] в качестве субстратов для трипсина дают возможность судить о количестве α_1 -АТ в крови, так как на долю этого ингибитора приходится 90% общей антитриптической активности сыворотки крови и антитриптическая активность α_2 -МГ при этом не измеряется.

Принципиальный подход к энзиматическому определению α_2 -МГ был сформулирован впервые Хавербек и соавт. [6], обнаружившими, что α_2 -МГ образует с трипсином комплекс, способный расщеплять низкомолекулярные субстраты практически с той же скоростью, что и свободный трипсин. Эта энзиматическая активность не тормозилась α_1 -АТ и ингибитором трипсина из бобов сои (СИТ). На этом принципе основаны все энзиматические методы определения α_2 -МГ и, в частности, обычно применяемый у нас метод Веремеенко и Волохонской [7], использующих БАПНА в качестве субстрата.

Отсутствие единообразия в предлагаемых методах определения уровня α_1 -АТ и α_2 -МГ (различные субстраты, концентрации субстратов, буферные смеси и т. д.) затрудняет параллельное их исследование в клинике. В настоящей работе предложен унифицированный метод определения уровня α_1 -АТ и α_2 -МГ в сыворотке (плазме) крови человека с использованием одного недефицитного коммерческого препарата субстрата — БАЭЭ.

В работе приведены некоторые сведения об α_1 -АТ и α_2 -МГ в норме, при ожоговой болезни и раке поджелудочной железы.

Методика

Для унифицированного метода определения уровня α_1 -АТ и α_2 -МГ в сыворотке крови человека необходимы следующие реактивы: 1) 0,05 М трис-НСl-буфер, рН 8,0; 2) 1,5 мМ раствор БАЭЭ·НСl (этиловый эфир N- α -бензоил-L-аргинина солянокислый; препарат изготовлен на заводе химических реактивов им. Войкова) в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8,0. Растворяют 6,2 мг БАЭЭ·НСl в 12 мл буфера, раствор готовят в день определения во избежание спонтанного гидролиза БАЭЭ; 3) 0,1% раствор трипсина в 1 н. НСl, содержащей 10 мМ СаСl₂; 5 мг трипсина [кристаллический препарат фирмы «Снофа», Чехословакия (18—20 Е), или отечественный препарат Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова] растворяют в 5 мл указанного растворителя; раствор может храниться в течение 7—10 дней при 4°C. Перед определением 0,1% раствор трипсина разводят в 10 раз 1 мМ НСl для определения уровня α_1 -АТ; 4) 0,3% раствор СИТ (ингибитор трипсина из бобов сои, препарат фирмы «Serva», ФРГ, или фирмы «Reanal», Венгрия) в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8,0; 3 мг СИТ растворяют в 1 мл указанного буфера.

Сыворотку крови человека перед определением уровня α_2 -МГ разводят в 10 раз физиологическим раствором, для определения уровня α_1 -АТ сыворотку крови разводят в 50 раз (0,5 мл разведенной 1 : 10 сыворотки крови добавляют к 2,0 мл физиологического раствора).

Определение уровня α_1 -АТ. В кюветах спектрофотометра готовят две пробы — опытную и контрольную. Опытная проба содержит 1,8 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 8,0, 0,1 мл разведенной 1 : 50 сыворотки крови и 0,1 мл раствора трипсина (10 мкг). Контрольная проба содержит 1,9 мл трис-НСl-буфера и 0,1 мл раствора трипсина (10 мкг). Обе пробы выдерживают в термостатированных кюветах спектрофотометра в течение 5 мин при 25°C. Затем добавляют в каждую пробу по 1 мл раствора БАЭЭ; быстро перемешивают и измеряют прирост оптической плотности при 253 нм (ΔD_{253}) против пробы, содержащей только реактивы (2 мл трис-НСl-буфера—1 мл раствора БАЭЭ); отсчеты делают каждую минуту в течение 4—5 мин.

Из линейного участка графика хода реакции находят прирост оптической плотности ΔD_{253} за 1 мин для опытной и контрольной проб, разность между этими величинами используют для вычисления активности α_1 -АТ по формуле:

$$\frac{(V_0 - V_i) \cdot 2,73 \cdot 50}{0,1} = \text{число, ингибиторных единиц на 1 мл сыворотки крови,}$$

где V_0 и V_i — скорости гидролиза БАЭЭ трипсином в контрольной и опытной пробах, соответственно равные приросту оптической плотности Δ_{253} за 1 мин; 2,73 — расчетный коэффициент для вычисления количества БАЭЭ, гидролизованного в пробе при данных условиях (в мкмоль); получен из данных по разности оптической плотности 1 мМ растворов БА и БАЭЭ, равной 1,1 и объема пробы 3 мл ($\frac{3}{1,1} = 2,73$); 0,1 — количество сыворотки крови, взятой для анализа (в мл); 50 — фактор разведения.

Активность α_1 -АТ и α_2 -МГ выражают числом условных ингибиторных единиц (ИЕ) в 1 мл сыворотки крови, принимая за 1 ИЕ такое количество сыворотки (плазмы) крови, которое тормозит (α_1 -АТ) или связывает (α -МГ) активность 1 Е трипсина, т. е. расщепление 1 мкмоль БАЭЭ за 1 мин.

Определение α_2 -МГ. В термостатированную кювету спектрофотометра с 1,75 мл 0,05 М трис-НСI-буфера, рН 8,0, вносят 0,1 мл разведенной 1 : 10 сыворотки крови и 0,05 мл раствора трипсина (50 мкг); преинкубируют в течение 5 мин при 25°C, после чего добавляют 0,1 мл раствора СИТ (300 мкг), перемешивают содержимое кюветы и через 5 мин добавляют 1 мл 1,5 мМ раствора БАЭЭ; пробу перемешивают и измеряют прирост оптической плотности при 253 нм в течение 10 мин против контрольной пробы, содержащей только реактивы (2 мл трис-НСI-буфера + 1 мл раствора БАЭЭ).

Активность α_2 -МГ выражают в ИЕ в 1 мл сыворотки и вычисляют по формуле:

$$\frac{\Delta D_{253}^{10} \cdot 2,73 \cdot 10}{0,1 \cdot 10} = \Delta D_{253}^{10} \cdot 27,3 = \text{ИЕ/мл,}$$

где ΔD_{253}^{10} — прирост оптической плотности в пробе за 10 мин (при линейном ходе реакции); 2,73 — расчетный коэффициент (см. метод определения α_1 -АТ); 10 — время измерения реакции (в мин); 0,1 — количество сыворотки крови, взятой для анализа (в мл); 10 — фактор разведения.

Иммунохимическое количественное определение α_1 -АТ проводили с использованием иммунодиффузионных пластинок фирмы «Беринг».

Иммунохимическое полуколичественное определение α_2 -МГ проводили методом радиальной иммунифузии в агаре [8] с использованием моноспецифической антисыворотки к α_2 -МГ фирмы «Беринг».

Результаты и обсуждение

Содержание главных ингибиторов протеиназ плазмы крови — α_1 -АТ и α_2 -МГ — характеризует течение и прогноз многих воспалительных и деструктивных процессов [2]. Определение уровня α_1 -АТ, помимо этого, имеет диагностическое значение: наследственная недостаточность α_1 -АТ часто сопровождается неспецифическими заболеваниями легких у взрослых [9] и циррозами печени у детей [10, 11].

Для облегчения параллельного исследования α_1 -АТ и α_2 -МГ в клинике предлагается унифицированный метод их определения в сыворотке крови с использованием одного доступного коммерческого препарата субстрата — БАЭЭ. Метод определения уровня α_1 -АТ подробно описан нами ранее [4, 5], он представляет собой модификацию метода [12] и основан на определении торможения БАЭЭ эстеразной активности трипсина разведенной в 50 раз сывороткой крови. В настоящей работе приводятся данные, свидетельствующие о специфичности предлагаемого нами метода определения α_1 -АТ. У 2 доноров и 2 больных ожоговой болезнью было проведено измерение активности и содержания α_1 -АТ различными методами — спектрофотометрическим (как указано в методике) и иммунохимическим — позволяющим измерить абсолютное содержание ингибитора.

На рис. 1 демонстрируются изменения содержания и активности α_1 -АТ у больного с ожогами II—III степени в динамике течения ожоговой болезни.

Как видно на рис. 1, измерение активности и содержания α_1 -АТ энзиматическим и иммунохимическим методами коррелирует друг с другом. Эти данные свидетельствуют о том, что измерение антитриптической активности плазмы крови используемым нами методом действительно отражает содержание α_1 -АТ. Сходный характер изменения общего количества α_1 -АТ

(иммунохимический метод) и его свободной формы (энзиматический метод) показывает, что плазма в первые дни обследования больных с ожогами не наводнена внутриклеточными протеиназами.

Предлагаемый нами метод определения α_2 -МГ основан на свойстве α_2 -МГ сыворотки крови человека образовывать с трипсином комплекс, сохраняю-

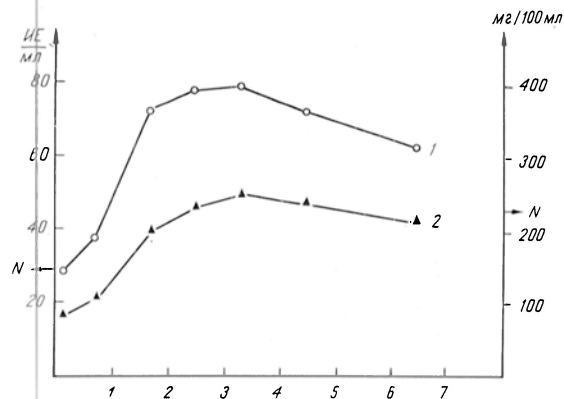


Рис. 1. Изменения содержания и активности α_1 -АТ в плазме крови больного с ожогами II—III степени в течение первых 7 дней болезни.

По оси абсцисс — время после ожога (в сут). 1 — иммунохимический метод измерения α_1 -АТ; 2 — спектрофотометрический метод определения α_1 -АТ. Стрелками указаны величины α_1 -АТ у доноров.

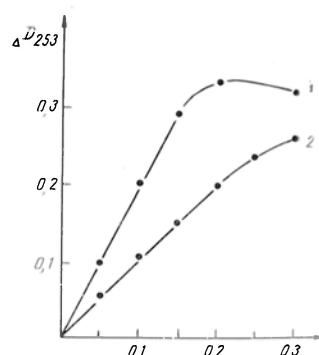


Рис. 2. Аргинин-эстеразная активность комплекса α_2 -МГ—трипсин в зависимости от количества плазмы крови человека.

По оси абсцисс — количество разведенной 1 : 10 плазмы (в мл). 1 — время гидролиза БАЭЭ 10 мин; 2 — время гидролиза БАЭЭ 5 мин.

щий способность расщеплять низкомолекулярные субстраты [6], определение проводится в присутствии ингибитора трипсина из бобов сои, связывающего свободный трипсин, некомплексированный с ингибиторами плазмы крови. Данный метод позволяет быстро и специфично определять в малом объеме (0,1 мл) сыворотки крови α_2 -МГ параллельно с определением α_1 -АТ с использованием одного недефицитного субстрата — БАЭЭ. Прежде чем предложить окончательную пропись метода определения α_2 -МГ, был проведен сравнительный анализ различных количеств сыворотки крови, трипсина, СИТ, а также различного времени преинкубации сыворотки крови с трипсином и СИТ.

На рис. 2 представлена зависимость активности комплекса α_2 -МГ—трипсин от количества взятой для анализа плазмы крови человека. Как видно на рис. 2, скорость расщепления БАЭЭ комплексом трипсин — α_2 -МГ прямо пропорциональна количеству добавленной сыворотки в диапазоне 0,05—0,25 мл (разведение 1:10). Оптимальным количеством мы считаем 0,1 мл, так как в этом случае получаются хорошо измеримые величины эн-

Т а б л и ц а 1

Зависимость активности комплекса α_2 -МГ—трипсин от количества трипсина в пробе и времени преинкубации сыворотки крови с трипсином и СИТ

Условия определения	ΔD_{253}^{10}
Количество трипсина в пробе, мкг:	
25	0,215
50	0,215
75	0,215
100	0,210
Время преинкубации с трипсином, мин (25°C):	
5	0,205
10	0,200
15	0,205
Время инкубации с СИТ, мин (25°C):	
2	0,215
5	0,215
10	0,220
15	0,215

зиматической активности (ΔD_{253}^{10}) и линейный ход реакции с данной концентрацией сыворотки сохраняется на протяжении 10—20 мин измерения.

В табл. 1 представлена зависимость активности комплекса α_2 -МГ—трипсин от концентрации трипсина в пробе и времени преинкубации с ферментом и СИТ.

Как видно из табл. 1, одинаковые результаты были получены при добавлении от 25 до 100 мкг трипсина в пробу; мы выбрали 50 мкг, так как известно, что при некоторых патологических состояниях организма содержание α_1 -АТ резко возрастает, в 2—4 раза превышая норму [2, 4]. Образование комплекса трипсин — α_2 -МГ происходит очень быстро; как видно из табл. 1, для его образования достаточно 5 мин, за 10 и 15 мин прироста активности не наблюдалось. Для инактивизации свободного, не связанного с α_2 -МГ трипсина достаточно также 2—5 мин.

Т а б л и ц а 2

Активность α_1 -АТ и α_2 -МГ (в ИЕ/мл) в плазме крови человека в норме и при некоторых патологических состояниях ($M \pm m$)

Обследуемая группа	n	α_1 -АТ	α_2 -МГ
Диспоры	18	29,9 \pm 1,2 (20—40)	4,9 \pm 0,12 (4,3—5,4)
Больные с ожогами II—III степени: шок	9	26,4 \pm 2,9 (17—43)	3,6 \pm 0,10 (3,4—4,3)
Токсемия: от 2—7 дней после ожога	17	55,8 \pm 0,8 (38—88)	3,1 \pm 0,17 (1,8—4,3)
14 сут после ожога	8	49,7 \pm 2,5 (46—57)	3,7 \pm 0,33 (3,0—4,6)
Больные раком поджелудочной железы	8	52,7 \pm 5,8 (41—79)	2,9 \pm 0,2 (2,4—3,5)

П р и м е ч а н и е. n — число обследованных образцов плазмы крови.

Параллельное определение α_1 -АТ и α_2 -МГ разработанным нами методом было проведено в плазме крови больных в динамике ожоговой болезни и у больных раком поджелудочной железы. Эти данные сравнительно с содержанием указанных ингибиторов в плазме крови здоровых людей приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, ингибиторная емкость крови по отношению к α_2 -МГ снижена у больных ожоговой болезнью в период шока и острой ожоговой токсемии на 30—40% по сравнению с α_2 -МГ у здоровых лиц. Наибольшее снижение α_2 -МГ соответствует 2 сут болезни, когда наблюдается резкое возрастание α_1 -АТ, совпадающее с явлениями интоксикации организма; на протяжении последующих 4—7 дней болезни активность α_2 -МГ несколько возрастает, но даже к 14-му дню болезни остается ниже нормы. Снижение уровня α_2 -МГ было подтверждено полуколичественным иммунохимическим методом определения с использованием моноспецифической антисыворотки к α_2 -МГ. Обнаруженное нами снижение уровня α_2 -МГ в плазме крови больных с ожогами в период шока и острой ожоговой токсемии свидетельствует о связывании этим ингибитором протеиназ плазмы крови и тканей, резко активизируемых в эти периоды болезни.

Уровень α_1 -АТ, являющегося главным ингибитором протеиназ лейкоцитов и тканей [13], возрастает в 2—4 раза через 24—48 ч после ожога (см. табл. 2) и удерживается на этом высоком уровне в течение всего периода ожоговой токсемии. Возрастание содержания α_1 -АТ на 2—6-й день болезни коррелирует с усилением процессов интоксикации организма, связанных с освобождением протеиназ лейкоцитов и тканей, и направлено на ликвидацию этих процессов.

Такая же разнонаправленность изменения двух главных ингибиторов сериновых протеиназ α_1 -АТ и α_2 -МГ обнаружена в плазме крови больных раком поджелудочной железы: уровень α_2 -МГ значительно снижен, тогда как α_1 -АТ резко повышен. Такой характер изменений уровня α_1 -АТ и α_2 -МГ связан, вероятно, с деструктивными процессами при данном заболевании, освобождением протеиназ и стремлением организма устранить эту угрозу. Содержание α_1 -АТ и α_2 -МГ может рассматриваться как важный показатель собственных защитных сил организма и имеет значение для прогноза болезни [1, 2].

Авторы выражают благодарность Н. А. Дидковскому за иммунохимическое определение α_1 -АТ и М. А. Адо за иммунохимическое определение α_2 -МГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Werle E., Zickgraf-Rudel G. — Z. klin. Chem., 1972, Bd 10, S. 139—150. — 2. Lewis D. A. — Biochem. Pharmacol., 1977, v. 26, p. 693—698. — 3. Покровский А. А. — В кн.: Биохимические методы исследования в клинике. Под ред. А. А. Покровского. М., 1969, с. 209—210. — 4. Пасхина Т. С., Шрайбер М. И., Яровая Г. А. и др. — Вопр. мед. химии, 1972, № 2, с. 137—144. — 5. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 188—191. — 6. Haverback B. J., Duse B., Bundy H. F. et al. — J. clin. Invest., 1962, v. 41, p. 972—980. — 7. Веремеенко К. И., Волохонская Л. И. — Лабор. дело, 1969, № 7, с. 394—397. — 8. Fahey J. L., McKelvey E. — J. Immunol., 1965, v. 94, p. 84—86. — 9. Laurell C. B., Eriksson S. — Clin. chim. Acta, 1965, v. 11, p. 395—398. — 10. Lieberman J. — N. Y. St. J. Med., 1976, v. 76, p. 181—186. — 11. Sharp H. Z. — Gastroenterology, 1976, v. 70, p. 611—621. — 12. Stofric K., Schwich G. — In: Protides of the Biological Fluids. 11th Colloquium. Ed. H. Peeters. Amsterdam, 1964, p. 411—413. — 13. Wintroub B. U., Goetze E. J., Austen K. F. — J. exp. Med., 1974, v. 140, p. 812—824.

Поступила 19/VII 1978 г

A METHOD FOR ESTIMATION OF α_1 -ANTITRYPSIN AND OF α_2 -MACROGLOBULIN IN HUMAN BLOOD SERUM (PLASMA) IN NORMAL STATE AND UNDER SOME PATHOLOGICAL CONDITIONS

N. F. Nartikova, T. S. Paskhina

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

A modified spectrophotometric method is developed for simultaneous estimation of α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin in human blood serum (plasma); the method is based on dissimilar interaction of these inhibitors with trypsin in the systems with a low molecular substrate N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester. α_1 -Antitrypsin was estimated by inhibition of the arginine esterase activity of trypsin in a mixture containing human blood serum diluted 50-fold. α_2 -Macroglobulin was estimated by maintained arginine esterase activity of the trypsin- α_2 -macroglobulin complex, formed after interaction of an excess of trypsin with blood serum, diluted 10-fold and after subsequent inactivation of free, unbound with α_2 -macroglobulin, trypsin by treatment with the soy bean inhibitor of trypsin. α_1 -Antitrypsin and α_2 -macroglobulin were estimated by means of the method described in blood serum of healthy persons and in patients with burns or with carcinoma of pancreas. The method enables to estimate two main inhibitors of blood plasma proteinases in a small volume of blood serum (0.1 ml) very rapidly and specifically using commercially available substrate; the method might be recommended for routine clinical analysis.

Н. В. Лихачева, В. А. Буробин, Ю. И. Барашичев, Е. А. Николаева

ДИАГНОСТИКА ГИСТИДИНЕМИИ С ПОМОЩЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОКАНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПОТЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Кафедра биохимии I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова, отдел клинической генетики Московского научно-исследовательского института педиатрии и детской хирургии Министерства здравоохранения РСФСР, Москва

Описан способ диагностики гистидинемии путем определения уроканиновой кислоты в поте энзиматическим методом с помощью высокоочищенного препарата уроканиназы из печени крыс. Определено содержание уроканиновой кислоты предлагаемым методом и известным химическим методом по восстановлению уроканиновой кислоты цинком в среде соляной кислоты у 7 детей, больных гистидинемией, и у 10 детей контрольной группы. У больных детей содержание уроканиновой кислоты в поте значительно снижено по сравнению с таковой у детей контрольной группы, что подтверждает диагноз заболевания. Предлагаемый метод отличается высокой чувствительностью, специфичностью, хорошей воспроизводимостью и точностью, а также быстротой и простотой выполнения.

Катаболизм гистидина в печени животных осуществляется путем превращения его в глутаминовую кислоту с образованием в качестве промежуточного продукта уроканиновой кислоты. Первую реакцию в цепи превращения гистидина — образование уроканиновой кислоты — катализирует фермент гистидаза, обнаруживаемый в печени и эпидермисе кожи. Отсутствие гистидазы или значительное снижение ее активности в печени и коже приводит к гистидинемии. Гистидинемия — одно из наиболее распространенных наследственных нарушений аминокислотного обмена. Ее частота среди новорожденных составляет в среднем 1:24 000 [1]. В результате наследственно обусловленного дефицита гистидазы блокируется путь превращения гистидина в уроканиновую кислоту. Следствием этого является накопление гистидина и снижение содержания уроканиновой кислоты в биологических жидкостях организма. Клинически заболевание характеризуется умственной отсталостью различной степени, нарушениями речи, судорогами. Диагностика гистидинемии основывается, помимо клинических данных, на обнаружении повышенной концентрации гистидина в крови и моче, снижения содержания уроканиновой кислоты в моче и поте, а также снижения активности гистидазы в коже и печени больных.

При проведении скрининга на гистидинемии на первом этапе обследования (для получения предварительных данных) используют следующие методы: определение количества гистидина в крови и моче с помощью ауксотрофных мутантных штаммов *E. coli* K-12 [2], ингибиторного теста Гатри [3] и бумажной хроматографии [4]. На последующих этапах обследования необходимо применение более совершенных, количественных и специфических методов для подтверждения диагноза гистидинемии, дифференцирования транзиторной гипергистидинемии новорожденных и детей раннего возраста, а также исключения вторичного дисбаланса аминокислот (в том числе гистидина), наблюдающегося при других заболеваниях.

По данным литературы, исследование содержания уроканиновой кислоты в поте проводили у 22 больных гистидинемией. У 19 из них она отсутствовала или ее уровень был значительно снижен, у 1 — повышен, а у 2 находился в пределах нормы. Следует отметить, что определение уроканиновой кислоты в этих исследованиях проводили либо полуколичественно — по спектру УФ-поглощения [5], либо хроматографическим методом, который достаточно трудоемок, что усложняет получение точных результатов.

В связи с важностью определения уроканиновой кислоты у больных гистидинемией было необходимо разработать высокочувствительный и точный метод определения этой кислоты в биологических жидкостях и тканях.

В данной работе описывается разработанный нами энзиматический метод определения уроканиновой кислоты в поте с использованием высокоочищенного препарата уроканиназы.

М е т о д и к а

Очистка уроканиназы. Для получения уроканиназы использовали печень белых крыс линии Вистар, содержащихся на стандартной диете. Получение бесклеточных препаратов печени и частичную очистку уроканиназы путем осаждения белков при рН 5,0 и фракционирования сульфатом аммония производили как описано в [6]. Дальнейшую очистку уроканиназы осуществляли путем гель-фильтрации через сефадекс G-200 (колонка размером 2,5×95 см, урановешенная 0,02 М калий-фосфатным буфером рН 7,2) и хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (колонка размером 1,0×70 см, урановешенная 0,02 М трис-НСl-буфером рН 7,8, элюция фермента ди-

Т а б л и ц а 1

Содержание уроканиновой кислоты (в мг на 1 г пота) в поте больных гистицинемией

Больной	Пол	Возраст	Энзиматический метод	Восстановление цинком
П.	М.	2 года 3 мес	0,01	0,03
Б.	Ж.	3 года	0,03	0,02
К.	М.	3 года	0,02	0,04
М.	М.	3 ¹ / ₂ года	0,05	0,05
М. В.	М.	3 ¹ / ₂ года	0,09	0,03
Ш.	Ж.	5 ¹ / ₂ лет	0,01	0,01
К. О.	Ж.	8 лет	0,05	0,05
			$\bar{x}=0,04\pm 0,012$	$\bar{x}=0,03\pm 0,01$

нейным градиентом KCl 0,025 М). Полученные фракции активного, высокоочищенного фермента, разлитые по пробиркам небольшими порциями, хранили в замороженном состоянии и использовали по мере надобности. В работе применяли препарат фермента с удельной активностью не ниже 150 имоль разрушенной уроканиновой кислоты в 1 мин на 1 мг белка.

Сбор пота у больных детей и у детей контрольной группы осуществляли с внутренней поверхности предплечья на кусочки фильтровальной бумаги размером 2,5×2,5 см после стимуляции потоотделения электрофорезом с нилокарпином [7]. Массу пота определяли по разнице массы сухой и влажной бумажек.

Энзиматический метод определения уроканиновой кислоты в поте заключается в том, что кусочки фильтровальной бумаги с потом заливают 5 мл 0,02 М калий-фосфатного буфера рН 7,2 на 10—15 мин. Полученный экстракт прогревают 2 мин на кипящей водяной бане, охлаждают и к 2,5 мл полученного экстракта добавляют 0,5 мл раствора очищенной уроканиназы. На спектрофотометре определяют плотность раствора при 277 нм. Смесь инкубируют при 37°C 30 мин и снова определяют плотность раствора. Количество уроканиновой кислоты, выраженное в миллиграммах в 1 г пота рассчитывают по формуле:

$$\frac{(E_1 - E_2) \times 2 \times 22}{A \times 1000},$$

где E_1 — E_2 — разность экстинкций до и после инкубации; 2 — коэффициент для определения уроканиновой кислоты во всем объеме экстракта (5 мл); раствор 22 мкг уроканиновой кислоты в 3 мл при рН 7,2 имеет плотность 1,00 (коэффициент молярной экстинкции 18 800); A — масса пота (в г), 1000 — коэффициент перевода микрограммов в миллиграммы.

Определение уроканиновой кислоты в поте после восстановления ее цинком в присутствии соляной кислоты проводили по описанному методу [8].

Активность гистидазы в коже определяли методом С. Р. Мардашева и соавт. [9].

Количество гистидина в крови определяли микробиологическим методом с использованием аукоотрофных мутантных штаммов *E. coli* K-12 [2].

Статистическую обработку результатов производили, как описано в [10].

Результаты и обсуждение

Определение уроканиновой кислоты в поте было проведено нами у 7 больных гистидинемией (4 мальчика и 3 девочки в возрасте от 2 до 8 лет) и 10 детей контрольной группы. В последнюю входили здоровые дети, а также больные с приобретенными заболеваниями.

Т а б л и ц а 2

Содержание уроканиновой кислоты (в мг на 1 г пота) в поте детей контрольной группы

Обследуемый	Пол	Возраст	Энзиматический метод	Восстановление цинком
И.	М.	1 год	0,21	0,17
А.	Ж.	1 год	0,14	0,07
Н.	М.	2 года	0,12	0,11
С.	М.	3 г. да	0,19	0,03
Ф.	Ж.	6 лет	0,31	0,31
А. А.	Ж.	7 лет	0,19	0,15
К.	Ж.	8 лет	0,42	0,22
Н. К.	Ж.	9 лет	0,15	0,09
К. Н.	Ж.	9 лет	0,31	0,23
Н. Н.	Ж.	12 лет	0,32	0,15
			$\bar{x}=0,24\pm 0,03$	$\bar{x}=0,15\pm 0,04$
			$P<0,05$	

К моменту обследования в клинической картине больных гистидинемией доминировала значительная умственная отсталость или задержка психомоторного развития в сочетании с нарушениями речи, судорогами. Уровень гистидина в крови натощак колебался от 6 до 20 мг на 100 мл (норма <4 мг на 100 мл). У всех детей была отмечена патологическая реакция на нагрузку гистидином в виде более значительного и продолжительного по сравнению с детьми контрольной группы повышения его уровня в крови, а также снижение или полное отсутствие активности гистидазы в коже, что подтверждало диагноз заболевания.

Т а б л и ц а 3

Содержание уроканиновой кислоты в стандартном растворе

Известное количество уроканиновой кислоты, нмоль	Статистический показатель			
	n	\bar{x}	σ	V, %
50	20	50,2	$\pm 1,3$	2,6
100	20	98,8	$\pm 1,28$	1,3
150	20	150,6	$\pm 1,64$	1,1
200	20	204,8	$\pm 2,6$	1,3

Определение уроканиновой кислоты в поте больных детей и детей контрольной группы было проведено описанным выше энзиматическим методом и

для сравнения известным методом спектрофотометрического определения уроканиновой кислоты после восстановления ее цинком в среде соляной кислоты. Результаты исследования представлены в табл. 1 и 2, из которых видно, что содержание уроканиновой кислоты в поте у больных гистидинемией значительно снижено по сравнению с таковым у детей контрольной группы.

Следует отметить, что результаты, полученные при определении содержания уроканиновой кислоты в поте методом восстановления ее цинком несколько ниже по сравнению с таковыми, полученными энзиматическим методом, что может быть связано с недостаточно полным восстановлением уроканиновой кислоты в системе с цинком и соляной кислотой. Кроме того, энзиматический метод определения уроканиновой кислоты в поте позво-

ляет дифференцировать больных гистидинемией от детей контрольной группы, в то время как метод с цинком в ряде случаев дает заниженные результаты, которые перекрываются значениями, полученными у больных гистидинемией.

Правильность результатов и точность предлагаемого энзиматического метода были проверены нами путем определения уроганиновой кислоты в растворах различной, заведомо известной концентрации (табл. 3).

Как видно из табл. 3, предлагаемый метод характеризуется чувствительностью, хорошей воспроизводимостью и точностью. Следует особо подчеркнуть, что предлагаемый метод выявления гистидинемии наряду с высокой избирательностью отличается от известных ранее методов быстротой и простотой выполнения.

Таким образом, энзиматический метод определения уроганиновой кислоты в поте может быть рекомендован для диагностики гистидинемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Levy H. L. — *Advanc. Human genet.*, 1973, v. 4, p. 1. — 2. Лбросимова Н. А., Сиванова Л. А., Марченко З. М. и др. — В кн.: Вопросы физиологии и патологии обмена веществ в детском возрасте. М., 1970, с. 22. — 3. Guthrie R. — *Birth Defects*, 1968, v. 6, p. 92. — 4. Efron M. L., Young M. D., Hoser H. N. et al. — *New Engl. J. Med.*, 1964, v. 270, p. 1378. — 5. Cain A. R., Holton L. B. — *Arch. Dis. Child.*, 1968, v. 45, p. 62. — 6. Николаев А. Я., Лихачева Н. В., Буробин В. А. и др. — *Биохимия*, 1976, № 7, с. 1279. — 7. McKendric T. — *Lancet*, 1962, N 1, p. 183. — 8. Whitfield A. E., Shepherd I. — *Clin. chim. Acta*, 1970, v. 29, p. 181. — 9. Мардашев С. Р., Бабаянц Р. С., Шахмейстер И. Я. и др. — *Вестн. дерматол.*, 1972, № 6, с. 35. — 10. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М., 1963.

Поступила 28/VII 1978 г.

ENZYMATIC ESTIMATION OF UROKANINIC ACID IN SWEAT FOR DIAGNOSIS OF HISTIDINEMIA

N. V. Likhacheva, V. A. Burobin, Yu. I. Barashnev, E. A. Nikolaeva

Chair of Biochemistry, I. M. Sechenov I Medical School, Department of Clinical Genetics, Institute of Pediatrics and Infant Surgery, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

A diagnosis of histidinemia was confirmed by estimation of urokaninic acid in sweat using highly purified preparation of urokaninase from rat liver tissue. The content of urokaninic acid was estimated by the method developed and by means of a known chemical method, which involved reduction of urokaninic acid with zinc in a medium containing HCL; seven children with histidinemia and ten healthy children were examined. The diagnosis of histidinemia was confirmed since the content of urokaninic acid was distinctly decreased in sweat of the impaired children as compared with the control group. The method developed was highly sensitive, reproducible and accurate.

УДК 612.398.145.1-087

Т. А. Оборотова, А. Е. Берман и В. И. Мазуров

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ФРАКЦИИ ПОЛИРИБОСОМ, ОБОГАЩЕННОЙ КОЛЛАГЕНОВЫМИ мРНК

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Проведена сравнительная характеристика двух методов выделения свободных и связанных полирибосом. Показано, что метод дифференциального центрифугирования позволяет быстро получить полирибосомную фракцию, которая содержит не-деградированные мРНК и обогащена коллагеновыми мРНК.

На основании полученных в настоящее время экспериментальных данных можно считать установленным, что секретируемые белки синтезируются в клетках высших организмов на полирибосомах, связанных с мембра-

нами эндоплазматического ретикулума (связанные полирибосомы), в то время как в синтезе внутриклеточных белков преимущественное участие принимают полирибосомы, не образующие комплекс с мембранами (свободные полирибосомы) [1—3].

Это обстоятельство обусловило использование связанных полирибосом в качестве источника для выделения информационных РНК некоторых секретируемых белков [4—6].

Однако при выборе указанного источника для выделения мРНК приходится учитывать два момента. С одной стороны, возникает необходимость эффективного разделения связанных полирибосом от свободных полирибосом и других внутриклеточных органелл, с другой стороны, процедура фракционирования полирибосом не должна сопровождаться деградацией полирибосомных мРНК. Первое из указанных требований удовлетворяется при фракционировании полирибосом с помощью получившего широкое применение метода Блобела и Поттера [7], основанного на различиях в седиментации внутриклеточных структур в растворах с относительно высокой плотностью (концентрированный сахароза). Эффективность очистки полирибосомных фракций, достигаемая с помощью этого приема, показана в более поздних работах [8, 9], однако недостатком указанного подхода является необходимость длительного центрифугирования фракций клеточного гомогената и связанная с этим возможность деградации полирибосомных мРНК. Это обстоятельство определило все большее распространение методов разделения полирибосомных фракций, основанных на различиях в скорости их седиментации в растворах с невысокой плотностью (методы дифференциального центрифугирования) [10—12].

В настоящей работе предложена процедура разделения свободных и связанных полирибосом из куриных эмбрионов с помощью дифференциального центрифугирования, и в качестве критерия эффективности фракционирования использована оценка интенсивности синтеза секретируемого белка — коллагена на той и другой фракции в бесклеточной системе белкового синтеза.

Методика

В опытах использовали 10-дневные куриные эмбрионы. Ткань эмбрионов гомогенизировали в 2,5 объемах буфера А (600 мМ сахароза, 50 мМ трис-НСl pH 7,6, 25 мМ KCl, 1 мМ ацетат магния, генарин 0,1 мг/мл) в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым поршнем (6 ходов поршня). Гомогенат фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость собирали, осадок ядер промывали буфером А и вновь центрифугировали. Митохондри из объединенной надосадочной жидкости удаляли центрифугированием при 12 000 g в течение 10 мин. Полученную при этом надосадочную жидкость центрифугировали при 30 000 g в течение 7 мин для разделения мембраносвязанных (осадок) и свободных (надосадочная жидкость) полирибосом. Для осаждения свободных полирибосом надосадочную жидкость наслаивали на 2 мл содержащего 2,0 М сахарозу буфера А в пробирках к ротору T-65 центрифуги «Spinko L5—65» («Beckman», США) и центрифугировали при 300 000 g в течение 3 ч. Осадок свободных полирибосом суспендировали в 2—3 мл буфера Б (25 мМ трис-НСl pH 7,6, 100 мМ KCl; 6 мМ ацетат магния, 1 мМ дитиотреитол).

Для удаления примесей свободных полирибосом мембраносвязанные полирибосомы суспендировали в буфере А и осаждали центрифугированием при 30 000 g в течение 7 мин. Эту процедуру повторяли трижды. Полученный осадок мембраносвязанных полирибосом суспендировали в 1—2 мл буфера Б. Суспензии связанных и свободных полирибосом хранили при -60°C .

Тотальный препарат аминоксил-тРНК-синтетаз выделяли по методу Хогланда и др. [13] из надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования постмитохондриальной фракции тканевого гомогената при 150 000 g в течение 90 мин.

Бесклеточная система белкового синтеза (конечный объем 0,2 мл) содержала 20—50 мкг полирибосом (по РНК), 80—200 мкг аминоксил-тРНК-синтетаз (по белку), а также 30 мМ трис-НСl pH 7,6, 100 мМ KCl, 6 мМ ацетат магния; АТФ 1 мМ, ГТФ 0,2 мМ, креатинфосфат 10 мМ («Calbiochem», США), креатинфосфаткиназу — 80 мкг/мл («Sigma», США), смесь 19 немецких аминокислот (кроме пролина) — 40 мМ каждой, дитиотреитол 1 мМ, [^3H]-пролин (удельная радиоактивность 50 Ки/ммоль) 10 мкКи. Инкубацию системы проводили при 37°C в течение 1 ч.

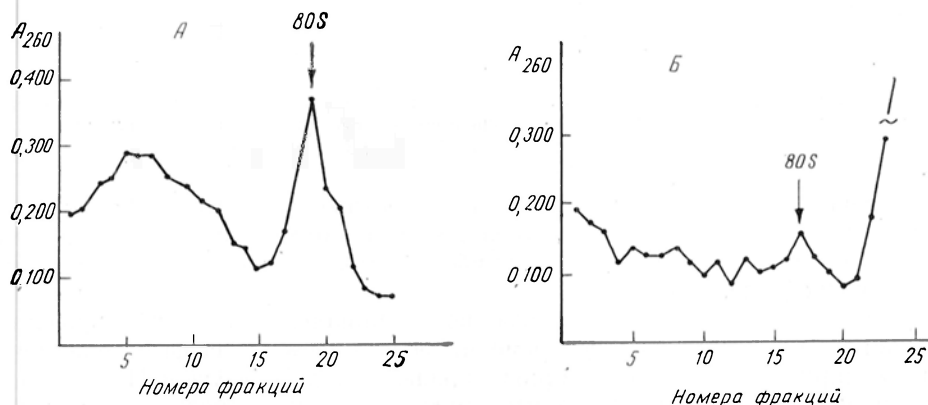
Для расщепления коллагеназой использовали 0,1 мл раствора синтезированных в системе радиоактивных белков (4000—10 000 имп/мин), содержащего 0,05 М трис-НСl-буфер рН 7,6 с 0,005 М CaCl₂. К опытным пробам добавляли 10 мкл раствора коллагеназы, не содержащей примесей других протеиназ. Пробы инкубировали при 37°C в течение 90 мин, после чего к контрольным и опытным пробам добавляли равный объем раствора 0,2 н. КОН, содержащего 1 мг/мл немеченого пролина, и смесь инкубировали 20 мин при 37°C. После инкубации пробы охлаждали и добавляли равный объем 10% трихлоруксусной кислоты с 0,5% танином. Выпавшие осадки собирали на миллипоровые фильтры, высушивали и определяли их радиоактивность. Количество расщепленных коллагеназой радиоактивных пептидов определяли по методу Петерковского и Дигелмана [14].

Седиментационный анализ фракций свободных и связанных полирибосом проводили с помощью центрифугирования в линейном градиенте концентраций сахарозы (5 мл, 10—40%), приготовленном на буфере Б. К суспензии связанных полирибосом для отделения их от мембран добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 1%. На градиент наносили 1,5—2,5 опт. ед. (A_{260}) полирибосом в 0,2 мл буфера Б. Центрифугирование проводили при 170 000 g (ротатор SW-50,1, центрифуга «Spinco L5-65») в течение 40 мин. После центрифугирования собирали фракции (начиная от дна пробирки) и определяли их оптическую плотность при 260 нм.

РНК и белок в полирибосомных фракциях определяли соответственно по методам Мейбаум [15] и Лоури и др. [16].

Результаты и обсуждение

Одним из критериев эффективности фракционирования свободных и связанных полирибосом, выделенных из различных тканей, является соотношение белка и РНК в полирибосомных фракциях. Величины этого от-



Седиментационный профиль свободных (А) и связанных (Б) полирибосом.

На рис. Б увеличение оптической плотности во фракциях 22—25 обусловлено присутствием тритона X-100.

ношения для фракции связанных полирибосом, по данным различных авторов [3, 8, 17], варьируют в пределах 0,14—0,25 в зависимости от ткани и метода разделения полирибосомных фракций, в то время как для свободных полирибосом это отношение равно 1.

Хорошо апробированный метод разделения свободных и связанных полирибосом, разработанный Блобелом и Поттером [7] и впоследствии модифицированный Аделманом и др. [8, 9], позволяет, как показано в указанных работах, практически полностью предотвратить перекрестное загрязнение полирибосомных фракций друг другом.

Действительно, по нашим данным [3], фракции свободных и связанных полирибосом, выделенные из куриных эмбрионов по указанному методу, характеризуются отношением РНК/белок, равным соответственно 1,0 и 0,1.

Учитывая указанный выше недостаток метода Блобела и Поттера [7], мы провели разделение полирибосомных фракций, полученных из того же источника, с помощью дифференциального центрифугирования. Химический

анализ показал, что для фракции связанных полирибосом отношение РНК/белок равно 0,14. Таким образом, подобранные нами условия дифференциального центрифугирования позволили выделить фракцию связанных полирибосом, практически не отличающуюся по химическому составу от аналогичной фракции, выделяемой из того же источника по методу Блобела и Поттера [7].

Седиментационный анализ свободных и связанных полирибосом, полученных с помощью дифференциального центрифугирования, показал (см. рисунок), что обе фракции характеризуются высоким содержанием тяжелых полирибосом (78%) по сравнению с моносомами (22%). Сопоставление данных седиментационного анализа связанных полирибосом, выделенных указанным методом, с ранее полученными нами результатами [3] ана-

Т а б л и ц а 1
Включение [³H]-пролина в белки, синтезированные в бесклеточной системе на свободных и связанных полирибосомах, выделенных из куриных эмбрионов

Полирибосомы	Содержание полирибосомной РНК в пробе, мкг	Включение, имп/мин на 1 мкг РНК
Свободные	50	4 350 800
	44	6 741 818
	26	4 595 000
Связанные	33	4 689 696
	24	6 224 166
	20	3 153 000

П р и м е ч а н и е. В таблице приведены результаты 3 типичных опытов.

лиза связанных полирибосом, выделенной методом Блобела и Поттера из той же ткани, не выявило существенных различий между этими фракциями как по содержанию тяжелых полирибосом, так и по общему седиментационному профилю.

Важным преимуществом метода дифференциального центрифугирования является резкое сокращение времени, затрачиваемого на фракционирование полирибосом. Так, если оригинальный метод Блобела и Поттера или его модификации включают длительную (до 24 ч) процедуру разделения фракций, то по предложенной в настоящей работе схеме выделение и очистка связанных полирибосом осуществляются не более чем через 1 ч после получения постмитохондриальной надосадочной жидкости.

В том случае, если полирибосомные фракции предполагается использовать для выделения различных классов полирибосомных мРНК, такое сокращение процедуры фракционирования имеет важное значение, поскольку оно уменьшает вероятность их деградации.

Одним из критериев нативности полирибосомных мРНК в составе фракций полирибосом является белоксинтезирующая активность этих фракций в условиях бесклеточной системы белкового синтеза. Как видно из табл. 1, фракции связанных и свободных полирибосом, полученные с помощью дифференциального центрифугирования, не различаются между собой по удельной белоксинтезирующей активности. С другой стороны, ранее полученные нами данные о белоксинтезирующей активности полирибосомных фракций, выделенных из той же ткани методом Блобела и Поттера [7], показывают, что в этом случае фракция связанных полирибосом вдвое менее активна в белковом синтезе, чем фракция свободных полирибосом [3]. На наш взгляд, это различие можно объяснить тем, что при разделении полирибосом методом Блобела и Поттера, предусматривающим длительное

Т а б л и ц а 2
Синтез коллагена на свободных и связанных полирибосомах в бесклеточной системе белкового синтеза

Полирибосомы	Синтезированный коллаген, %
Свободные	8, 10, 5 (8)
Связанные	47, 46, 42, 47, 40 (44)

П р и м е ч а н и е. В таблице приведены средние данные (в скобках) и отдельные данные 3—5 опытов.

центрифугирование полирибосомного материала, имеет место деградация связанных полирибосом под действием нуклеаз мембранного происхождения.

При оценке возможности использования связанных полирибосом, полученных предложенным в настоящей работе методом, в качестве источника для выделения коллагеновых мРНК необходимо было установить, в какой мере указанная полирибосомная фракция обогащена коллагеновыми матрицами. В этом случае целесообразна бесклеточная система белкового синтеза с последующим определением содержания коллагеновых полипептидов в синтезированном продукте. Как видно из табл. 2, коллагеновые полипептиды составляют ~50% от всех белков, синтезированных в бесклеточной системе на связанных полирибосомах, выделенных указанным методом. Более того, при сравнении коллагенсинтезирующей активности фракций связанных полирибосом, выделенных нами в настоящей работе с помощью дифференциального центрифугирования или методом Блобела и Поттера [3], видно, что первый из указанных методов позволяет получить фракцию, более активную в синтезе полипептидов коллагеновой природы в бесклеточной системе. Этот результат также можно объяснить большей сохранностью коллагеновых мРНК, обусловленной сокращением времени фракционирования полирибосом.

Таким образом, метод дифференциального центрифугирования позволяет быстро получить полирибосомную фракцию, которая, с одной стороны, содержит недеградированные мРНК, а с другой — обогащена коллагеновыми мРНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. McIntosh P. R., O'Toole K. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 457, p. 171—212. — 2. Shore G. C., Tata J. R. — *Ibid.*, 1977, v. 472, p. 197—236. — 3. Берман А. Е., Оборотова Т. А., Мазуров В. И. — *Биохимия*, 1975, т. 40, с. 432—440. — 4. Faust C. H., Diggelmann H., Mach B. — *Biochemistry (Wash.)*, 1973, v. 12, p. 925—931. — 5. Harrison T. M., Brownlee G. G., Milstein C. — *Europ. J. Biochem.*, 1974, v. 47, p. 621—627. — 6. Assari L., Gave P., Hondebine L. M. — *Biochimie*, 1976, v. 58, p. 325—331. — 7. Blobel G., Potter V. R. — *J. molec. Biol.*, 1967, v. 28, p. 539—542. — 8. Adelman M. R., Blobel G., Sabatini D. D. — *J. Cell. Biol.*, 1973, v. 56, p. 191—205. — 9. Adelman M. R., Blobel G., Sabatini D. D. — *Ibid.*, 1973, v. 56, p. 206—229. — 10. Harrison T. M., Brownlee G. G., Milstein C. — *Europ. J. Biochem.*, 1974, v. 47, p. 613—620. — 11. Van Venrooij W. J., Gieljens A. L. G., Janssen A. P. M. et al. — *Ibid.*, 1975, v. 56, p. 229—238. — 12. Ramsey J. C., Steele W. J. — *Biochem. J.*, 1977, v. 168, p. 1—6. — 13. Hoagland M. B., Stephenson M. L., Scott J. E. et al. — *J. biol. Chem.*, 1958, v. 231, p. 241—257. — 14. Peterkofsky B., Diegelmann R. F. — *Biochemistry (Wash.)*, 1971, v. 10, p. 988—994. — 15. Мейбаум В. В. — *Биохимия*, 1945, т. 10, с. 353—359. — 16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265—275. — 17. Andrews T. M., Tata J. R. — *Biochem. J.*, 1971, v. 121, p. 683—694.

Поступила 18/X 1978 г.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF TWO METHODS FOR ISOLATION OF POLYRIBOSOME FRACTION, ENRICHED IN COLLAGEN mRNA

T. A. Oborotova, A. E. Berman, V. I. Masurov

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

Two methods for isolation of free and bound polyribosomes were compared. The method of differential centrifugation enabled to obtain rapidly a polyribosome fraction, containing undegraded mRNA enriched in the collagen mRNA.

РЕЦЕНЗИЯ

УДК 612.014.462.1/3-087.4:543.42(049.32)

В. П. Верболович. *Инфракрасная спектроскопия биологических мембран*. Казахская ССР, Наука, 1977, 128 с.

Изучение организации и функции биологических мембран, контролирующих самые различные и многообразные процессы жизнедеятельности путем осуществления структурной, барьерной, энергетической, пластической и векторной функций, является одним из наиболее важных направлений в биологии. Повреждение мембран — один из универсальных патологических механизмов, реализующихся при различных по этиологии и патогенезу патологических состояниях. Кроме того, действие большинства лекарственных препаратов и биологических регуляторов проявляется на уровне мембран, а их различные превращения и детоксикация происходят также в мембранной фазе клеток.

Для изучения структуры мембран в настоящее время широко применяют физические методы — дисперсию оптического вращения, дифракцию рентгеновских лучей, спиновые зонды, ядерный магнитный и электронный парамагнитный резонанс, спектроскопию в УФ-свете и ИФ-области. Метод инфракрасной спектроскопии обладает высокой чувствительностью и дает, помимо количественных характеристик, информацию о структуре и пространственной ориентации биополимеров, являющейся результатом их взаимодействия в сложно организованном комплексе биологической мембраны. Этот метод используется для изучения конформации белка, расшифровки природы и силы взаимодействия белковых и липидных компонентов (в мембранах эритроцитов, митохондрий, эндоплазматического ретикулума клеток печени). Однако сложности в интерпретации полученных данных не всегда позволяют полностью реализовать получаемые результаты. Автор настоящей монографии сделал попытку сопоставить изменения структурных параметров мембран и их функциональных свойств, активности связанных с мембраной ферментов, фосфорилирующего окисления субстратов, транспорта катионов.

Автором обобщены данные литературы и собственный опыт по применению инфракрасной спектроскопии для изучения структуры биологических мембран. Показаны возможность регистрации с помощью этого метода видовых, органических и функциональных особенностей мембран, прижизненных перестроек конформации белков, а также соотношение белковых и липидных компонентов мембраны. Большое внимание автор уделяет влиянию локальных (дикаиин) и ингаляционных (эфир, фторотан) анестетиков, стероидного наркоза и нейролептанальгезии на структуру мембран митохондрий, саркоплазматического ретикулума (большая часть экспериментов выполнена на прямой мышце живота человека). Сопоставлены изменения активности АТФ-азы микросомальной фракции и структуры мембран миокарда в условиях искусственной гипотермии и острой циркуляторной гипоксии. Обсуждается возможность использования инфракрасных спектров мембран эритроцитов при экстремальных воздействиях.

Монография состоит из 4 глав. В первой главе «Принцип метода и его применение для изучения биологических мембран» кратко изложена теория метода и представлены общепринятые подходы к интерпретации спектров белков, фосфолипидов и липопротеидных комплексов.

Во второй главе «Особенности структуры различных типов мембран» представлены данные, полученные при применении инфракрасной спектроскопии для оценки особенностей структуры митохондрий, эндоплазматического ретикулума легочной ткани, скелетной и сердечной мышц. Рассмотрены сходство и различия спектральных характеристик мембран мышц человека и экспериментальных животных, влияние условий выделения субклеточных структур на их поглощение в инфракрасной области.

В третьей главе «Влияние общих и локальных анестетиков на структурно-функциональные параметры мембран» автор по данным инфракрасной спектроскопии представил анализ взаимодействия общих и регионарных анестетиков с мембранами митохондрий и саркоплазматического ретикулума прямой мышцы живота человека.

В четвертой главе «Характеристика мембран саркоплазматического ретикулума миокарда в условиях гипоксии и гипотермии» обобщен ценный опыт автора по исследованию микросомальной фракции миокарда собак в экспериментах, имитирующих отдельные этапы операции на сердце (некусственная гипотермия, выключение сердца из кровообращения, восстановление гемодинамики, согревание).

Бесспорным достоинством книги является в целом успешная попытка сочетать новый для биологии мембран физический принцип с задачами клинической и медицинской биохимии. По нашему представлению, эта монография является первым

опытом такого подхода. В книге есть некоторые недостатки. К числу их сл. сти использование не самых современных методов выделения мембранных фр. и не достаточно корректное определение активности транспортных АТФ-аз. с зсвойств промежуточного интермедиата транспортных АТФ-аз проведена с зрения концепций, подвергаемых в настоящее время обоснованной критике. (Моле. лярная организация и механизм функционирования натрий-насоса. Болдырев А. А., Твердислов В. А. Итоги науки и техники, Биофизика т. 10, М., 1978.) Хотелось бы пожелать автору при переиздании этого весьма полезного пособия учесть новые данные литературы и привлечь к обсуждению представляемых исследований более современные.

Давая общую оценку настоящего издания, следует учесть, что автором впервые в отечественной литературе коротко изложены основные принципы метода инфракрасной спектроскопии в применении к биологическим мембранам, тем самым успешно осуществлена цель — помочь хирургам, анестезиологам, врачам-биохимикам глубже понять молекулярные механизмы обезболивания и процессы, протекающие в живом организме в экстремальных условиях (под влиянием анестетиков, хирургического вмешательства на фоне общего охлаждения и выключения сердца из кровообращения). Несомненно четкое представление об особенностях взаимодействия лекарственных препаратов с белками и липидами на уровне клетки и субклеточных структур, правильная оценка физико-химических последствий такого взаимодействия и его биологического значения дают возможность глубже и точнее интерпретировать их клинические проявления. Поэтому следует считать весьма удачным издание этой монографии, а саму книгу рекомендовать как биологам-теоретикам (экспериментаторам), применяющим современные физико-химические методы в изучении мембранных процессов, так и практическим врачам, совершенствующим диагностические подходы в решении насущных практических задач.

Л. В. Стойда, А. А. Болдырев (Москва)

СОДЕРЖАНИЕ

- ✓ *Розенфельд Е. Л.* О нарушении транспорта глюкозо-6-фосфата как возможной причине гликогеноза типа Ib 371
- Веремеенко К. Н., Погорелая Н. Ф.* Применение аэросилов при активации прекалликреина плазмы крови 375
- Соколова В. Е., Любарцева Л. А.* Влияние флавоноидов на некоторые стороны азотистого обмена при экспериментальной уремии 379
- Кильдема Л. А.* Изменения изоферментного состава пируваткиназы при гепатоканцерогенезе 383
- Кулинский В. И., Кононова Л. И., Саворенко Н. С.* Исследование обмена триптамина у человека 387
- Ялкут С. И., Данилова С. А., Кульчицкий О. К.* Исследование активности фосфодиэстеразы цАМФ в лейкоцитах больных бронхиальной астмой 392
- Никольская И. И., Аникичева Н. В., Александрова С. С., Дебов С. С.* Обнаружение плазмид в клетках *E. coli* CK 395
- Мужиченко А. В., Хардина Г. А.* Влияние брюшно-тифозного эндотоксина и липида А на содержание фосфолипидов в ткани печени 398
- Панченко Л. Ф., Антоненков В. Д.* Энзиматическая характеристика фракции пероксисом, выделенной с использованием гипотонической обработки субклеточных структур 402
- Фоменко П. И., Ребров Л. Б.* Изучение посмертного ингибирования синтеза РНК в печени и скелетных мышцах крыс 408
- Силаева С. А., Данилова Н. И.* Изоферменты митохондриальной тимидинкиназы из нормальной и пролиферирующих тканей печени крыс 415
- Плесков В. М., Саакян И. Л., Житнухин Ю. Л.* Индукция экспериментального аллергического энцефаломиелимита энцефалитогенными белками миелина из спинного мозга быка 420
- Матвеев В. Н., Камерин В. К., Гайдамак А. Н., Балдин Ю. П.* Мукополисахариды, коллаген и кальций костного регенерата при замещении дефекта кости методом монолокального компрессионно-дистракционного остеосинтеза 423
- Плесков В. М., Саакян И. Л.* Активность и изоферментный состав гексокиназы и лактатдегидро-

CONTENTS

- Rosenfeld, E. L.:* On the Impairment of Glucose-6-Phosphate Transport as a Probable Cause of Glycogenesis of the Ib Type 371
- Veremeenko, K. N., Pogorelaya, N. F.:* Use of Airosiles in Activation of Prekallikrein from Blood Plasma 375
- Sokolova, V. E., Lyubartseva, L. A.:* Effect of Flavonoids on Some Patterns of Nitrogen Metabolism in Experimental Uremia 379
- Kil'dema, L. A.:* Alterations of Isoenzyme Spectrum of Pyruvate Kinase in Hepatocarcinogenesis 383
- Kulinsky, V. I., Kononova, L. I., Savorenko, N. S.:* Tryptamine Metabolism in Man 387
- Yalkut, S. I., Danilova, S. A.:* Activity of cAMP Phosphodiesterase in Leukocytes of Patients with Bronchial Asthma 392
- Nikol'skaya, I. I., Anikeycheva, N. V., Alexandrova, S. S., Debov, S. S.:* Detection of Plasmids in *E. coli* CK Cells 395
- Muzhichenko, A. V., Khardina, G. A.:* Effect of Typhoid Endotoxin and Lipid A on Content of Phospholipids in Liver Tissue 398
- Panchenko, L. F., Antonenkov, V. D.:* Enzymatic Characteristics of the Peroxisome Fraction, isolated by Hypotonic Treatment of Subcellular Structures 402
- Fomenko, P. I., Rebrov, L. B.:* Postmortal Inhibition of RNA Synthesis in Rat Liver Tissue and Skeletal Muscles 408
- Silaeva, S. A., Danilova, N. I.:* Isoenzymes of Mitochondrial Thymidine Kinase from Normal and Proliferating Rat Liver Tissues 415
- Pleskov, V. M., Saakyan, I. L., Zhitnukhin, Yu. L.:* Induction of Experimental Allergic Encephalomyelitis by Encephalitogenic Protein of Myelin from Bovine Spinal Cord 420
- Matveenko, V. N., Kamerin, V. K., Gaydamak, A. N., Baldin, Yu. P.:* Mucopolysaccharides, Collagen and Calcium of Bone Regenerate in Substitution of Bone Impairment Using a Method of Monolocal Compression-Distrubutional Osteosynthesis 423
- Pleskov, V. M., Saakyan, I. L.:* Activity and Isozyme Spectra of Hexokinase and Lactate Dehydrogenase from

- геназы растворимой фракции различно функционирующих мышц кролика в норме и при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите
- 427 *Сорокин А. С., Якобсон Г. С.* Изменение активности ферментов углеводного обмена печени после однократной интоксикации крыс четыреххлористым углеродом
- 433 *Скляднева В. Б., Чекановская Л. А., Тихоненко Т. И.* Об идентификации аминокислот, участвующих во взаимодействии с ДНК в составе вирусного нуклеопротеида
- 436 *Пчелкина З. М., Матвеев Б. П., Рыкунов Е. И., Терентьев А. А., Татаринцов Ю. С.* Иммунохимическое изучение α -глобулинов в опухолевой ткани почки человека
- 439 *Плетень А. П., Учитель И. А., Мазо В. К., Никуличева С. И., Волкова Л. И., Шатерников В. А.* Выделение ренина из почек человека
- 441 *Леонтьева Т. П., Казаков А. Л., Рыженков В. Е.* Влияние суммы флавоноидов из клевера красного и пута обыкновенного на содержание липидов в крови и печени крыс
- 444 *Герасимов А. М., Королева Л. А., Иванова Л. И., Панченко Л. Ф.* Глутатион: дегидроаскорбат-оксидоредуктазная активность тканей крыс
- 447 *Дмитриев Л. Ф., Иванов И. И.* О распределении восстановительных эквивалентов в клетке в активной фазе метаболизма бенз[а]пирена
- 451 *Мананкова Н. М., Нестеренко Э. А., Аргутинская С. В., Салганик Р. И.* Влияние ранней постнатальной индукции микросомальных ферментов на их активность и содержание холестерина в крови взрослых мышей гиперхолестеринемической линии
- 456 *Кунерт Э., Доведова Е. Л.* Влияние световой депривации на обмен ГАМК в субклеточных фракциях зрительной системы кроликов
- 460 *Лопухин Ю. М., Бородин Е. А., Сергиенко В. И., Халилов Э. М., Зюляев А. И., Люсов В. А., Арчаков А. И.* Содержание холестерина в эритроцитах человека и кролика при атеросклерозе и экспериментальной гиперхолестеринемии
- 466 *Иванов В. В., Жирнов Г. Ф., Бачманова Г. И., Мазуров А. В., Арчаков А. И.* Взаимодействие акрилонитрила с системой микросомального окисления печени крыс
- 468 *Герасимова Е. Н., Торховская Т. И., Перова Н. В., Базанов Е. А.* Липопротеиды плазмы крови и фракции коллагена аорты кроликов с различной степенью атеросклероза
- 471 *Sorokin, A. S., Yakobson, G. S.*: Alteration in Activity of Enzymes of Carbohydrate Metabolism in Rat Liver Tissue after an Intoxication with CCl_4
- Sklyadnaya, V. B., Chekanovskaya, L. A., Tikhonenko, T. I.*: On the Identification of Amino Acids, Interacting with DNA in Viral Nucleoprotein
- Pchelkina, Z. M., Matveev, B. P., Rykunov, E. I., Terent'ev, A. A., Tatarinov, Yu. S.*: Immunochemical Study of α -Globulins from Human Kidney Tumors
- Pleten, A. P., Uchitel, I. A., Mazon, V. K., Nikulicheva, S. I., Volkova, L. I., Shaternikov, V. A.*: Isolation of Renin from Human Kidney
- Leont'eva, T. P., Kazakov, A. L., Ryzhenkov, V. E.*: Effect of Total Flavonoids from *Trifolium Pratense* and *Bertholletia Humb* on Content of Lipids in Rat Liver Tissue and Blood
- Gerasimov, A. M., Koroleva, L. A., Ivanova, L. I., Panchenko, L. F.*: Activity of Glutathione: dehydroascorbate Reductase in Rat Tissues
- Dmitriev, L. F., Ivanov, I. I.*: On the Distribution of Reducing Equivalents in Cell During the Active Phase of Benz[a]Pyrene Metabolism
- Manankova, N. M., Nesterenko, E. A., Argutinskaya, S. V., Salganik, R. I.*: Effect of Early Postnatal Induction of Microsomal Enzymes on Their Activity and Content of Cholesterol in Blood of Aged Mice of Strain SWR/Y with Hypercholesterolemia
- Kunert, E., Dovedova, E. L.*: Effect of Light Deprivation on Metabolism of γ -Aminobutyric Acid in Subcellular Fractions of Rabbit Brain Visual System
- Lopukhin, Yu. M., Borodin, E. A., Sergienko, V. I., Khalilov, E. M., Zyulyaev, A. I., Lyusov, V. A., Archakov, A. I.*: Content of Cholesterol in Human and Rabbit Erythrocytes in Atherosclerosis and Experimental Hypercholesterolemia
- Ivanov, V. V., Zhirnov, G. F., Bachmanova, G. I., Masurov, A. V., Archakov, A. I.*: Interaction of Acrylonitrile with the System of Microsomal Oxidation in Rat Liver Tissue
- Gerasimova, E. N., Torkhovskaya, T. I., Perova, N. V., Basanov, E. A.*: Lipoproteins from Blood Plasma and Collagen Fractions from Aorta of Rabbits with Various Degree of Atherosclerosis

- Гобеев В. Н., Березов Т. Т. Активность некоторых ключевых ферментов гликолиза и дыхания в печени крыс при химическом канцерогенезе 480
- ✓ Розе Л. В., ✓ Розенфельд Е. Л., ✓ Попова И. А., Вихерт А. М., Быковская К. Н. Особенности регуляции обмена гликогена у крыс с экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатией 484
- Раков С. С., Федосеева В. Н., Вотрин И. И. Исследование гепатогенных пейссерий на содержание гистидиндекарбоксилазы 491
- Методы биохимических исследований**
- ✓ Нартикова В. Ф., ✓ Паскина Т. С. Унифицированный метод определения активности α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека 494
- Лихачева Н. В., Буробин В. А., Барашнев Ю. И., Николаева Е. А. Диагностика гистидинемии с помощью определения уроканиновой кислоты в поте энзиматическим методом 500
- ✓ Оборотова Т. А., ✓ Берман А. Е. и ✓ Мазуров В. И. Сравнительная характеристика двух методов выделения фракции полирибосом, обогащенной коллагеновыми мРНК 503
- Gobeev, V. N., Beresov, T. T.: Activity of Some Key Enzymes of Glycolysis and Respiration in Rat Liver Tissue in Chemical Carcinogenesis
- Rose, L. V., Rosenfeld, E. L., Popova, I. A., Vihert, A. M., Bykovskaya, K. N.: Patterns of Regulation of Glycogen Metabolism in Rats with Experimental Autoimmune Cardiomyopathy
- Rakov, S. S., Fedoseeva, V. N., Votrin, I. I.: Absence of the Histidine Decarboxylase in Nonpathogenic Neisseria Flava, Sicca
- Methods of Biochemical Investigations**
- Nartikova, V. F., Pashkina, T. S.: A Method for Estimation of α_1 -Antitrypsin and of α_2 -Macroglobulin in Human Blood Serum (plasma) in Normal State and Under Some Pathological Conditions
- Likhacheva, N. V., Burobin, V. A., Barashnev, Yu. I., Nikolaeva, E. A.: Enzymatic Estimation of Urokaninic Acid in Sweat for Diagnosis of Histi-dinemia
- Oborotova, T. A., Berman, A. E., Masurov, V. I.: Comparative Characteristics of Two Methods for Isolation of Polyribosome Fraction, Enriched in Collagen mRNA

Рецензия

Book Reviews

Техн. редактор Н. К. Арибжанова

Корректор П. Ф. Карасева

Сдано в набор 08.05.79. Подписано в печать 14.06.79. Формат 70×108¹/₁₆ Бумага тип. № 1
Гарнитура литературная Печать высокая Печ. л. 9,0 +печ. л. вкл. 0,13 усл. печ. л. 12,78
Уч.-изд. л. 13,93 Тираж 2017 Цена 80 коп. Заказ 1145

Издательство «Медицина». Москва 101838, Петровский пер., 6/8.
Чеховский полиграфический комбинат Союзполиграфпрома
Государственного комитета СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области