

В. А. Владимирцев, Д. А. Лебедев

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОБМЕНЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОМ ПОЛИМОРФИЗМЕ КОЛЛАГЕНА (Обзор)

Институт ревматизма АМН СССР, Москва

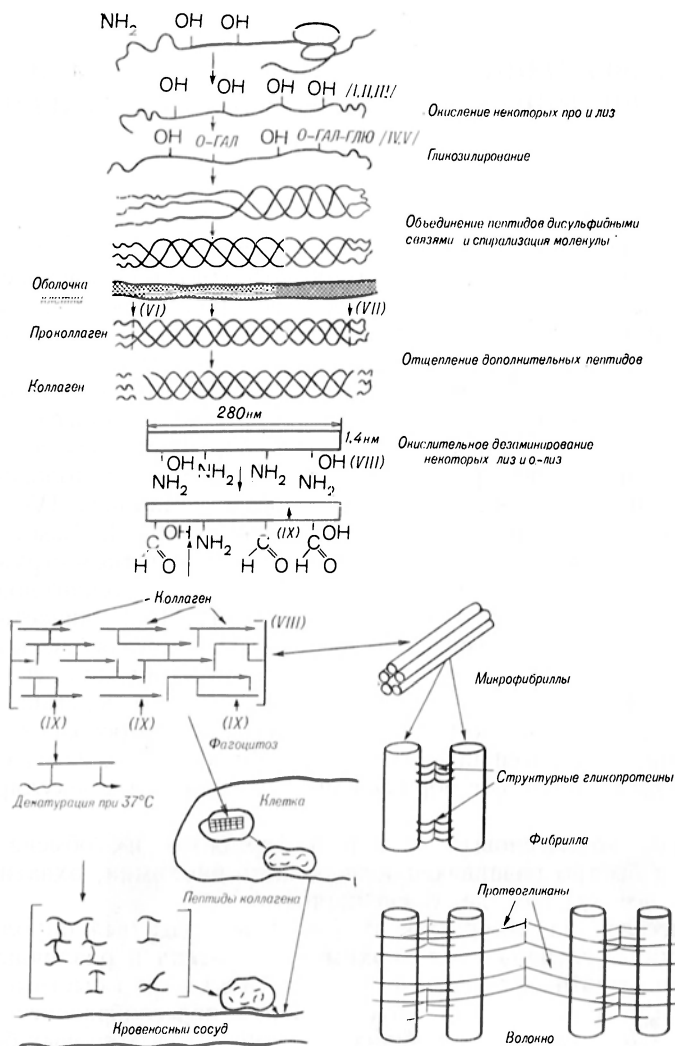
Возрастающий интерес специалистов разных областей биологии и медицины к проблемам биохимии коллагена, вероятно, обусловлен следующими обстоятельствами. Во-первых, в настоящее время признано, что, помимо опорно-механической роли, коллаген играет активную роль в процессах морфогенеза, клеточной дифференцировки и регенерации [1—5]. Во-вторых, количественные и качественные нарушения синтеза, созревания и распада коллагена являются важным звеном патогенеза многих заболеваний. Уже выяснены молекулярные механизмы нарушения обмена коллагена, лежащие в основе некоторых вариантов врожденной патологии соединительной ткани, таких, как синдром Элерса — Данлоса IV—VII типов, несовершенный остеогенез, гомоцистинурия и др. [6, 7]. Имеются многочисленные данные, указывающие на изменение метаболизма и структурных характеристик коллагена при ряде заболеваний — коллагенозах [6—9], циррозах печени [10, 11], атеросклерозе [7, 12, 13], диабете [7, 14]. В-третьих, изучение коллагена приобретает большое практическое значение: препараты коллагена все шире применяются в медицине для лечения ожогов, ран, хронических язв и т. п. [15, 16]. В-четвертых, вследствие уникальной структуры, своеобразия обменных характеристик, способности к спонтанной самосборке коллаген представляет удобную модель для изучения биосинтеза белков и процессов образования сложных надмолекулярных структур [17].

Изучение коллагеновых белков и ферментов их обмена составляет обширную и быстро развивающуюся область биохимии, охватить которую становится все труднее даже специалистам.

В отечественной литературе в последние годы был опубликован ряд обзоров и книг, посвященных биохимии коллагена и различным аспектам его практического использования [5, 15—18]. Однако быстрые темпы развития этой области биохимии обуславливают целесообразность периодического краткого суммирования общих сведений о коллагеновых белках в свете самых последних достижений. Настоящий обзор является попыткой такого суммирования.

Молекула коллагена состоит из 3 полипептидных цепей, вытянутых и закрученных в спираль вокруг общей оси. Длина молекулы 280 нм, диаметр 1,4 нм, молекулярная масса 300 000 дальтон. Индивидуальная полипептидная цепь — так называемая α -цепь — состоит приблизительно из 1000 аминокислотных остатков. Анализ первичной структуры α -цепей показал, что более 95% длины составляют повторяющиеся последовательности триплетов гли—х—у, где позиция х и у может быть занята различными аминокислотными остатками, за исключением остатков цистеина и ароматических аминокислот. Часто позиция х занята пролином, а у — оксипролином. Относительно высокое содержание иминокислот и характерное распределение глицина в цепях коллагена необходимы для образования тройной спирали и придания молекуле жесткости [5, 15, 19, 20].

Биосинтез, посттрансляционные модификации и распад коллагена показаны на рисунке [6, 7, 21—27]. Видно, что коллаген синтезируется на рибосомах гранулярного эндоплазматического ретикулула. Прежде чем войти в состав коллагеновых фибрилл, про- α -цепи, а затем и молекулы проколлагена претерпевают ряд посттрансляционных внутри- и внеклеточных изменений, которые происходят под влиянием многочисленных ферментов (табл. 1 и 2).



Этапы биосинтеза внеклеточной сборки и распада коллагена. Объединенные и модифицированные схемы Уитто и Лихтенштейна [6], Джексона и Стивена [23], Воезнера [26], Смита [85]. Римскими цифрами обозначены ферменты обмена коллагена, приведенные в табл. 1 и 2.

На самом раннем этапе, — вероятно, еще в процессе сборки коллагеновых полипептидных цепей — начинается окисление части пролиновых и лизиновых остатков, в котором участвуют 3 фермента — пролил-3-, пролил-4- и лизилгидроксилаза [21, 36]. Биологическая роль оксипролина, окисленного в 4-м положении, заключается в стабилизации конформации трехспиральной молекулы коллагена. Известно, что при ингибировании процесса окисления пролина коллаген денатурируется при физиологических условиях [6]. Функциональная роль 3-оксипролина пока не выяснена. Оксилизин участвует в образовании поперечных связей [22] и, кроме того, служит

местом, где углеводные остатки присоединяются к нему через α - β -гликозидную связь. Последнюю реакцию катализируют коллагенгалактозил- и коллагенглюкозил-трансфераза [21]. Значение углеводных компонентов в коллагене окончательно не определено. Предполагают, что они влияют на диаметр коллагеновых фибрилл [76] и на характер и количество поперечных связей в них [22]. По-видимому, они играют важную роль в процессах минерализации [77], во взаимодействии коллагена с протеогликанами [78] и неколлагеновыми пептидами [79].

Таблица 1

Внутриклеточные ферменты, участвующие в посттрансляционных модификациях коллагена

Фермент	Молекулярная масса, дальтон	pH-оптимум	Кофакторы и ко-субстраты	Ингибиторы	Источник выделения	Примечание
I — Пролил-4-гидроксилаза (КФ 1.14.11.2)	240 000 [28, 29]	7,4 [30]	O_2 , Fe^{2+} , α -кетоглутарат, аскорбат [7]	α , α' -Дипиридил [7], дивалентные катионы [32], аналоги катехоламинов [33], денатурированный коллаген [34]	Эмбрионы цыпленка [28], кожа плода человека [29], крысы [31]	
II — Пролил-3-гидроксилаза	160 000 [35]	—	То же [36]	—	Корковый слой почек крысы [35, 36]	—
III — Лизил-гидроксилаза (КФ 1.14.11.4)	580 000 и 220 000 [32]	7,4 [163]	То же [7]	Дивалентные катионы [31], аналоги катехоламинов [38]	Эмбрион и хрящ эмбриона цыпленка [32]	Фермент, вероятно, содержит углеводы [32]
IV — Коллагенгалактозилтрансфераза (КФ 2.4.1.50)	450 000, 200 000 и 50 000 [39, 40]	7,0 [37]	Mn^{2+} , УДФ-галактоза [42]	Некоторые нуклеотиды и их производные, сахароза, лактоза, п-меркурбензоат, Co^{2+} , галактозил-оксилизин [39—42]	Эмбрион цыпленка [39, 40]	То же [41]
V — Коллагенглюкозилтрансфераза (КФ 2.4.1.66)	72 000 [43], 72—78 000 [44]	8,3 и 9,9 [43]	Mn^{2+} , УДФ-глюкоза [42, 45, 46]	Некоторые нуклеотиды и их производные, тинин, п-меркурбензоат, сахароза [42, 45, 46]	Артерии теленка [43], эмбрионы цыпленка [44—46]	» » [44]

N- и C-концевые участки про- α -цепей приблизительно 120—130 аминокислотных остатков по аминокислотному составу резко отличаются от центральной части молекулы. Здесь содержатся остатки ароматических аминокислот и цистеина, тогда как остатков глицина и пролина относительно немного. Кроме того, на C-концевом участке молекулы проколлагена определены значительные количества углеводных остатков — манноза, галактоза, глюкоза и галактозамин; в N-концевой области обнаружен только глюкозамин [47]. Предполагается, что эти так называемые дополнительные пептиды необходимы для быстрого и эффективного соединения про- α -цепей, а также для предотвращения спонтанной полимеризации молекул внутри клетки [21]. Объединение полипептидных цепей начинается с образования межцепевых дисульфидных связей на C-конце молекул проколлагена. Затем, после формирования тройной спирали, молекулы транспортируются в вакуоли пластинчатого комплекса и секретируются во внеклеточное пространство [21].

Внеклеточный этап модификации структуры молекул проколлагена начинается с отщепления дополнительных пептидов с N- и C-концов молекулы. Проколлаген, лишенный N- или C-концов молекулы, принято называть соответственно P_c - или P_N -коллагенами [52]. Ферменты, осуществляющие отщепление концевых пептидов, называются P_N - или P_c -коллаген протеазы либо NH_2 - или $COOH$ -терминальный проколлаген протеазы [50—52]. В результате отщепления концевых пептидов проколлаген превращается в кол-

лаген. Таким образом, в этом процессе участвуют не менее 2 протеиназ. Причем действие этих ферментов строго специфично, так как и на N-, и на C-концах молекулы остается последовательность аминокислот в 15—50 остатков, не входящая в состав тройной спирали коллагена и имеющая нехарактерный для центрального участка молекулы состав. При неспецифическом же протеолизе проколлагена, например, пепсином эти участки отщепляются. Выяснено, что последние имеют существенное значение для стабилизации надмолекулярных структур коллагена, поскольку находящиеся здесь остатки оксипролина участвуют в образовании поперечных связей [80—82].

Т а б л и ц а 2

Внеклеточные ферменты, участвующие в модификациях и деструкции коллагена

Фермент	Молекулярная масса, дальтон	pH-оптимум	Кофакторы и косубстраты	Ингибиторы	Источник выделения	Примечание
VI — NH ₂ -терминальная проколлаген-протеаза	70 000 и 140 000 [48], 260 000 [49]	7,0—7,5 [48], 7,4 [49]	Ca ²⁺ [48, 49], Mn ²⁺ или Mg ²⁺ [49]	Меркаптоэтанол, глутатион, Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , ЭДТА [48]	Сухожилие теленка [48], сухожилие цыпленка [49]	Фермент, вероятно, содержит углеводы [49]
VII — COOH-терминальная проколлаген-протеаза [50—52]	—	—	Ca ²⁺ [51]	ЭДТА [51], конкавалин А [50]	Сухожилие цыпленка [50, 51]	То же [50]
VIII — Лизин-оксидидаза	62 000 [53], 28 000 [54], 59 000—61 000 [56]	—	О ₂ , Cu ²⁺ [54—56], пиридоксальфосфат [13, 59, 60]	β-Аминопропионитрил [61], дитиотрейтол [56, 58, 60]	Хрящ эмбриона цыпленка [53, 51, 57], аорта цыпленка [56]	Фермент проявил максимальную активность на сформированных фибриллах коллагена [55]
IX — Коллагеназа (КФ 3.4.24.3)	35 000 [62], 60 000 [63], 38 000 [64], 33 000 [65, 66], 32 000—35 000 [67]	7,5—8,5 [61—64], 7,0—9,5 [66]	Ca ²⁺ [25, 66], Zn ²⁺ [69, 70]	ЭДТА, цистеин, 1,10-о-фенантролин, дитиотрейтол [62, 63, 66, 70], этилендиамид [70], d-пеницилламин [66], Na-ауротиофилет [63], синохронные белки: α ₂ -макроглобулин, β ₂ -антиколлагеназа [62, 63], тканевые ингибиторы из кости, кожи, ткани опухоли, культуры фибробластов и т. д. [63, 66, 71, 72]	Десна собаки [62], слизистая оболочка желудка человека [64], ревматоидная синовиальная оболочка, карцинома [66], фибробласты синовиальной оболочки кролика [68]	$K_m = 1,01 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ [67]

Молекулы коллагена способны спонтанно объединяться в фибриллы. Однако эти фибриллы не обладают достаточной прочностью, пока не образуются ковалентные связи между α-цепями соседних молекул. Первой ступенью образования таких связей является окислительное дезаминирование ε-NH₂-групп некоторых лизиновых и оксипролиновых остатков под действием лизилоксидазы. В результате реакции образуются остатки δ-полуальдегида-α-аминоадипиновой кислоты (аллизина) или δ-полуальдегида-δ-окси-α-аминоадипиновой кислоты (оксиаллизина). Поперечные связи, образующиеся путем альдольной конденсации 2 альдегидов, характерны для внутримолекулярного связывания α-цепей коллагена. Образующийся в результате реакции вторичный альдоль может участвовать в межмолекулярной связи [22]. Основные связи типа шиффовых оснований образуются путем конденсации ε-NH₂-групп оксипролина с альдегидом. Двойная связь шиффова основания дегидродоксилизиннорлейцина спонтанно переходит в более ста-

бильную кетоформу. Гистидино-оксимеродесмозин образует поперечные связи между 4 α -цепями коллагена [22]. Таким образом, возникает значительное количество различных вариантов связей, характер образования которых пока окончательно не выяснен.

Объединение молекул коллагена в фибриллярные структуры происходит со сдвигом относительно друг друга приблизительно на $1/4$ длины молекулы. При таком их расположении взаимодействие противоположно заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков максимально [19, 84]. В настоящее время нет единого мнения относительно пространственной организации микрофибрилл. В одной из наиболее принятых моделей предполагается, что микрофибрилла состоит из параллельно расположенных вдоль общей оси 4 или 5 молекул коллагена [19, 85, 86]. Диаметр такой микрофибриллы 3—5 нм. Микрофибриллы объединяются в структуры большего диаметра, из которых формируются коллагеновые фибриллы. Роль цементирующего вещества между фибриллами отводится структурным гликопротеинам [23]. Структурные гликопротеины — это сравнительно недавно выделенный и изученный класс веществ соединительной ткани [87]. В состав этих белков входят глюкоза, фруктоза и сиаловые кислоты. Интересно, что в составе структурных гликопротеинов обнаружена такая уникальная кислота, как оксализин, характерная для коллагена. Структурные гликопротеины связываются с коллагеном прочными, возможно, ковалентными связями. Предполагают, что существенную роль в этом взаимодействии играют альдиминные связи, возникающие между ϵ -NH₂-группами лизина и гексозами [164, 165]. Комплексы коллагена с гликопротеинами, взаимодействуя с протеогликанами, объединяются в более крупные структуры. Связь коллагена с протеогликанами обеспечивается электростатическим взаимодействием между сульфатными группами протеогликанов и ϵ -NH₂-аминогруппами лизила и гуанидиновыми группами аргинина.

Процессы катаболизма коллагена в целом менее изучены, чем его биосинтез. Распад коллагена — сложный многоступенчатый процесс, проходящий как внутри клеток, так и внеклеточно.

Внеклеточную деструкцию коллагена начинает высокоспецифичная нейтральная коллагеназа, которая способна воздействовать не только на свободные, но и на агрегированные в фибриллы молекулы коллагена [25, 88, 89]. Несмотря на отсутствие каталитической активности, латентная коллагеназа способна связываться с коллагеновыми фибриллами [83]. Известно, что активирование коллагеназы происходит в результате ограниченного протеолиза [24]. Предполагают, что ключевая роль в ее активировании *in vivo*, в частности при воспалительных реакциях, принадлежит плазмину [90, 91]. Показано также, что активирование фермента может происходить не только в присутствии протеиназ, но и под влиянием реагентов, связывающихся с тиоловыми группами [92—94]. Поэтому пока трудно однозначно ответить на вопрос, является ли латентная коллагеназа зимогеном или представляет собой комплекс фермента с ингибитором. Однако в последнее время многие авторы склоняются в пользу второго предположения [92, 94, 95]. Наличие ингибиторов коллагеназы было показано в экстрактах различных органов и тканей [92, 96], синовиальной жидкости [92], культуральной среде человеческих фибробластов [97] и т. д.

В зависимости от вида ткани молекулярная масса ингибиторов составляет 6000—12 000 дальтон [90]. Интересно, что в роли ингибиторов коллагеназы могут выступать дополнительные пептиды N- и C-концевых участков молекулы проколлагена, отщепляющиеся после выхода молекулы из клетки [100]. Этим, по-видимому, обеспечивается «безопасность» вновь синтезированных молекул коллагена от действия коллагеназы. Коллагеназа атакует спиральный участок молекулы, расщепляя все 3 α -цепи на расстоянии примерно $3/4$ от N-конца [25]. При этом независимо от генетического типа коллагена всегда гидролизуются связи между остатками глицина и лейцина (изолейцина) [101, 102]. Однако следует отметить, что в зависимости от

источника фермента его каталитическая активность не всегда одинакова по отношению к разным изоформам коллагена. Так, если коллагеназа, синтезируемая в культуре человеческих эмбриональных фибробластов, расщепляет коллаген I и III типов с одинаковой скоростью, то коллагеназа, находящаяся в гранулах полиморфноядерных лейкоцитов, разрушает коллаген I типа в 15 раз быстрее, чем коллаген III типа [103]. Кроме того, скорость деструкции зависит от природы субстрата. Например, коллаген II типа расщепляется при воздействии синовиальной коллагеназы значительно медленнее, чем коллаген I и III типов [101, 104].

В результате расщепления коллагена нейтральной коллагеназой образуются два фрагмента, температура денатурации которых на 5°C ниже нормальной температуры тела. Дальнейшее расщепление денатурированных сегментов молекулы может происходить также экстрацеллюлярно под действием специфических и неспецифических нейтральных протеаз [25, 105].

В настоящее время появились также сообщения о том, что на первом этапе разрушения фибриллярных форм коллагена принимают участие деполимеризующие ферменты типа катепсина G и эластазы полиморфноядерных лейкоцитов. Эти энзимы действуют на неспиральные N-концевые участки молекул коллагена, способствуя переходу молекул в растворимое состояние [74, 105]. Есть сообщение об участии в этих процессах также катепсина D [75].

Кроме того, как растворимые, так и нерастворимые формы коллагена могут расщепляться внутриклеточно, в фаголизосомах — набором лизосомальных ферментов, таких, как катепсин В и коллагенолитический катепсин [106]. На степень устойчивости коллагеновых фибрилл к действию этих протеаз большое влияние оказывают локализация и количество межмолекулярных поперечных связей, а также количество и тип связанных с коллагеном протеогликанов. При этом генетический тип коллагена имеет, по-видимому, меньшее значение [107]. Лизосомальные гликозидазы, действуя на протеогликаны, входящие в состав фибрилл, способствуют растворению фибриллярных форм коллагена [107]. В фаголизосомах при кислых значениях pH частично деградированные фибриллы набухают, что облегчает проникновение гидролаз к труднодоступным при нейтральном pH связям, главным образом в области телопептидов. Предполагают, что при этом катепсин В и коллагенолитический катепсин расщепляют разные связи [106].

Наконец, имеются данные о существовании еще одного своеобразного, но неизученного пока пути деградации значительных количеств коллагена. Найдено, например, что около $1/3$ вновь синтезированного эксплантами легочной ткани коллагена чрезвычайно быстро, в течение нескольких минут, разрушается до весьма мелких пептидов с молекулярной массой менее 200 дальтон [108]. Показано, что этот процесс не зависит от действия экстрацеллюлярных ферментов или фагоцитоза и затрагивает, по-видимому, α -цепи еще до образования ими тройной спирали. Предполагают, что он служит для тканеспецифического контроля количества и качества коллагена, секретируемого клетками.

Образующиеся в результате деградации коллагена низкомолекулярные пептиды либо выводятся из организма с мочой, либо расщепляются до аминокислот специфическими ферментами, в частности пролидазами и пролиназами [27]. Оксипролин, освобожденный из этих пептидов, окисляется в печени, и небольшая его часть выводится с мочой [11, 7].

Данные, на основании которых была составлена настоящая схема обмена коллагена, были получены в основном при изучении коллагена I типа. Однако за последние несколько лет установлено, что для формирования разных видов соединительной ткани организмом используются разные типы коллагена. В настоящее время из тканей млекопитающих выделено и охарактеризовано 4 генетически различных типа коллагена [101]. Имеются сообщения об открытии новых изоформ [109—111, 119]. Кроме того, в по-

пуляции молекул каждого типа существует микрогетерогенность, возникающая вследствие посттрансляционных модификаций структуры молекул, что существенно увеличивает многообразие вариантов коллагена.

Наиболее распространенной изоформой является коллаген I типа; он содержится в коже, костях, сухожилиях и других тканях. В 1961 г. Пиз и соавт. [112], фракционируя денатурированный кожный коллаген на КМ-целлюлозе, установили, что его молекула содержит 2 типа α -цепей. α -Цепи элюирующиеся в 1-м пике, назвали $\alpha 1(1)$ -цепями, во 2-м — $\alpha 2$ -цепями. Молекула коллагена I типа состоит из двух $\alpha 1(1)$ -цепей и одной $\alpha 2$ -цепи — $[\alpha 1(1)]_2\alpha 2$. Полная аминокислотная последовательность $\alpha 1(1)$ -цепи уже установлена [19]. Заключается выяснение аминокислотной последовательности $\alpha 2$ -цепи. Она отличается первичной структурой от $\alpha 1(1)$ -цепи и кодируется отдельным геном. Для $\alpha 2$ -цепи характерно более высокое содержание оксипролина и остатков неполярных аминокислот. Распределение вдоль цепи остатков полярных аминокислот и иминокислот очень схоже [19, 101]. В целом в строении $\alpha 1(1)$ - и $\alpha 2$ -цепи отмечается выраженная гомология. С помощью метода гибридизации соматических клеток человека и мыши показано, что генные локусы, определяющие структуру человеческого коллагена I типа, локализованы в 7-й хромосоме [113].

Новый тип α -цепей был обнаружен в 1969 г. при исследовании хрящевого коллагена [114]. Эти α -цепи элюировались с КМ-целлюлозы в позиции, характерной для $\alpha 1$ -цепей коллагена I типа, но имели отличия в аминокислотном составе, поэтому их обозначили $\alpha 1(11)$ -цепи. Молекула коллагена, выделенного из хряща, состоит из трех $\alpha 1(11)$ -цепей. Эту изоформу — $[\alpha 1(11)]_3$ — называли коллагеном II типа. Полная аминокислотная последовательность $\alpha 1(11)$ -цепи пока не выяснена, тем не менее сравнение первичной структуры расшифрованных участков $\alpha 1(11)$ -цепи [115, 116] с аналогичными областями $\alpha 1(1)$ -цепи показало сильно выраженную гомологию — совпадение почти 80% аминокислотных остатков. Характерной особенностью $\alpha 1(11)$ -цепей по сравнению с $\alpha 1(1)$ - и α цепями является более высокое содержание окисленных остатков лизина, а также ди- и моносахаридов [101, 115, 116]. Углеводные компоненты представлены глюкозил-галактозилем и галактозилем, которые присутствуют примерно в равных количествах.

Недавно Батлер и соавт. [117] сообщили о существовании 2 форм $\alpha 1(11)$ -цепи. Эти варианты, найденные при изучении аминокислотной последовательности $\alpha 1(11)$ -цепей коллагена носового хряща быка, назвали $\alpha 1(11)$ -Major- и $\alpha 1(11)$ -Minor-цепями. Они определяются в хряще в отношении 7 : 1. Удалось показать, что в $\alpha 1(11)$ -Minor-цепи имеется по меньшей мере 2 аминокислотных замещения по сравнению с $\alpha 1(11)$ -Major-цепью. Авторы считают, что эти варианты $\alpha 1(11)$ -цепи кодируются отдельными структурными генами.

Коллаген II типа содержится главным образом в гиалиновом хряще. Кроме того, он обнаружен в фиброзном кольце и студенистом ядре межпозвоночного диска, а также в роговице, склере и других отделах оболочки глазного яблока [118].

Первые данные о существовании $\alpha 1(III)$ -цепей были получены в 1971 г. Миллер и соавт. [120], анализируя пептиды, изолированные после расщепления нерастворимого коллагена кожи цианогебромидом, обнаружили 2 новых СВ-пептида, неспецифичных для коллагена I типа. Предположили, что эти пептиды образуются при расщеплении полипептидной цепи типа $\alpha 1$, так как по аминокислотному составу они напоминали $\alpha 1(1)$ -СВ3, $\alpha 1(1)$ -СВ4 и $\alpha 1(1)$ -СВ5. Поэтому их и обозначили $\alpha 1(III)$ -СВ3 и $\alpha 1(III)$ -СВ6.

В 1974 г. Чанг и Миллер [121] после ограниченного протеолиза нерастворимого коллагена ряда тканей пепсином выделили и охарактеризовали коллаген III типа. Молекула этой изоформы построена из 3 α -цепей — $[\alpha 1(III)]_3$ [121—123].

Из α -цепи коллагена III типа кожи человека выделено 9, а из α -цепи коллагена III типа кожи теленка — 10 СВ-пептидов. Определены их молекулярная масса и аминокислотный состав. Установлен линейный порядок расположения этих пептидов в $\alpha 1(III)$ -цепи [124]. В настоящее время известна полная аминокислотная последовательность человеческих $\alpha 1(III)$ -СВЗ-, $\alpha 1(III)$ -СВ7- и $\alpha 1(III)$ -СВ6-пептидов [125], что составляет около $1/4$ длины $\alpha 1(III)$ -цепи. Первичная структура СВ-пептидов коллагена теленка расшифрована более полно [124, 126]. Можно сказать, что в строении $\alpha 1(III)$ -цепей, как и $\alpha 1(I)$ -цепей, отмечается выраженная межвидовая гомология, для $\alpha 2$ -цепей межвидовые различия первичной структуры более отчетливы.

Особенности аминокислотного состава $\alpha 1(III)$ -цепи представлены в табл. 3.

Таблица 3
Генетически различные типы коллагена [6, 7, 41, 111, 166, 167]

Тип коллагена	Источник выделения	Молекулярная форма	Индивидуальные цепи, входящие в состав молекулы	Аминокислотные остатки/1000 остатков						Углеводные остатки/1000 аминокислотных остатков	
				гли	про	3-опро	4-опро	лиз	олиз	гал	глю-гал
I	Кожа, сухожилия, строма внутренних органов и др.	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$	$\alpha 1(I)$ $\alpha 2$	380 331	118 114	1.1 1.2	114 105	27 20	10 12	0 1	1 1
$\alpha 1(I)$ -Тример	Культуры хондроцитов, опухоли	$[\alpha 1(I)]_3$									
II	Галиновый хрящ	$[\alpha 1(II)]_3$	$\alpha 1(II)$	333	121	2	99	22	14	4	5
III	Те же, что и для коллагена I типа	$[\alpha 1(III)]_3$	$\alpha 1(III)$	350	107	—	125	30	5	0	1
IV	Базальные мембраны	$[\text{про-}\alpha 1(IV)]_3$	$\alpha 1(IV)$	310	61	11	130	10	44	2	32
V	Плодные оболочки и др.	$(\alpha A)_2\alpha B$	αA αB	319 322	97 118	2.5 2.9	109 109	18 20	24 35	3 5	5 29
C1g-компонент комплемента	Сыворотка крови	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ацетилхолин-эстераза	Синапсы	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

При электронно-микроскопическом исследовании SLS-форм (сегментов с длинным периодом) коллагена I и III типов были показаны различия в длине их молекул. Нашли, что не образующий спиральной структуры С-концевой участок молекулы солерастворимого коллагена III типа на 5 нм длиннее [127]. Позже установили, что С-концевой неспиральный участок $\alpha 1(III)$ -цепи состоит из 56 аминокислотных остатков, в то время как соответствующий участок $\alpha 1(I)$ -цепи содержит только 25 остатков [126].

При изучении SLS-форм коллагена I и III типов было выявлено большое сходство в распределении остатков полярных аминокислот, что наряду с уже известными данными об аминокислотной последовательности позволяет рассматривать $\alpha 1(III)$ -цепь как гомологичную $\alpha 1(I)$ - и $\alpha 2$ -цепям. Однако в определенных участках SLS-препаратов отмечены четкие различия в интенсивности и расположении индивидуальных полос [128], причем они выражены более резко по сравнению с различиями между SLS-препаратами коллагена I и II типов [129, 130]. Следует отметить также, что фибриллы, образованные молекулами коллагена III типа, имеют меньший диаметр, чем фибриллы коллагена I типа [128]. По данным Флейшмайер и соавт. [131], диаметр ретикулиновых фибрилл (коллаген III типа) равен 10—60 нм, а фибрилл коллагена I типа — 90—110 нм.

In vitro показано, что в отличие от коллагена I и II типов коллаген III типа менее устойчив к воздействию протеаз. Например, трипсин разрывает все 3 $\alpha 1(III)$ -цепи нативной молекулы, специфически расщепляя связи

между остатками аргинина и глицина в положении 780—781 на участке, чувствительном к действию коллагеназы [132]. Термолизин (КФ 3.4.24.4) и некоторые другие эндопептидазы также способны «атаковать» эту область молекулы [133]. Интересно, что сродство денатурированных и нативных форм коллагена III типа к фибронектину [134] — белку, локализованному, в частности, на клеточной мембране фибробластов и индуцирующему прикрепление клеток к коллагеновым структурам — значительно выше, чем у других изоформ [135]. По некоторым данным [136, 137], способность коллагена III типа вызывать агрегацию тромбоцитов более выражена, чем у коллагена I типа.

Выявлена тесная связь между коллагеном III и I типов в одних и тех же тканях [101, 118, 138—140], за исключением костей и сухожилий. Возможно, механические свойства тканей в значительной степени зависят от соотношения между коллагеном I и III типов. Более подробные сведения о коллагене I—III типов приведены в ряде обзоров [5, 19, 101].

При изучении химического состава базальных мембран было установлено, что в них содержится большое количество оксипролина, оксилизина и глицина — аминокислот, типичных для коллагена [141]. После обработки при низкой температуре протеолитическими ферментами удалось выделить коллаген из базальных мембран почечных клубочков [141, 142], капсулы хрусталика [141, 143, 144] и десцеметовой оболочки [143]. В 1971 г. Кефалидес [141, 145] сообщил, что молекулы коллагена, изолированные из вышеуказанных источников, состоят из 3 идентичных α -цепей, отличающихся от α -цепей коллагена I—III типов, и предложил называть эту изоформу коллагеном IV типа. Аминокислотный состав коллагена базальных мембран имеет ряд особенностей, главным образом в содержании оксипролина, оксилизина и цистеина (см. табл. 3). Как видно из приведенных данных, суммарное содержание остатков пролина и оксипролина почти такое же, как и в других изоформах, однако количество окисленных остатков пролина значительно выше. Так, 3-оксипролина содержится в 5—10 раз больше, чем в коллагене I—III типов, а 4-оксипролина — на 30% больше, чем в коллагене I и II типов. Оксилизина обнаружено в 7 раз больше, чем в коллагене I и III типов, и приблизительно в 2 раза больше, чем в коллагене II типа. Кроме того, отмечается довольно высокое содержание цистеина, который отсутствует в коллагене I и II типов [145, 146]. Особенностью химического состава коллагена базальных мембран является также необычайно высокое по сравнению с другими изоформами содержание углеводных компонентов, представленных в основном гексозами. Если в коллагене I типа имеется только 0,4%, а в коллагене II типа — 3% углеводов, то в коллагене базальных мембран определяется 12% сахаров. При этом около 95% углеводов присоединены к остаткам оксилизина в форме дисахаридов — глюкозил-галактозиллов, а остальные — в форме моносахарида — галактозила. Менее 0,2% углеводов составляют манноза и галактозамин [141, 142, 146].

В последние годы были получены данные, свидетельствующие о неоднородности субъединичного состава коллагена базальных мембран [147, 148]. Так, при восстановлении коллагена, изолированного после ограниченного протеолиза, из базальных мембран почечных клубочков [142, 146] определяется несколько α -цепей с молекулярной массой от 65000 до 140 000 дальтон. Гетерогенность коллагеновых компонентов отмечается также в тех случаях, когда для их растворения не использовался протеолиз исходной ткани [149, 150]. При этом молекулярная масса выделенных пептидов находилась в интервале между 25 000 и 205 000 дальтон. Чанг и соавт. [148] предположили, что в формировании базальных мембран различных органов участвуют 3 типа молекул коллагена, которые входят в состав этих мембран в различных комбинациях. При этом, если молекулы двух форм образованы из α -цепей, размеры которых близки к размерам α -цепей коллагена I—III типов, то α -цепи, образующие третью форму, значительно меньше.

Однако представления о генетической гетерогенности α -цепей коллагена базальных мембран разделяют не все ученые. Тимпль и соавт. [151], исследовавшие коллагеновые белки базальных мембран мышинной саркомы EHS, экстрагированные 0,5 М уксусной кислотой из тканей латиричных животных, также идентифицировали по меньшей мере 2 коллагеновых компонента с молекулярной массой про- α -цепей. При расщеплении этих компонентов цианогенбромидом определялся одинаковый набор СВ-пептидов, что достаточно определенно свидетельствовало о генетической идентичности фракций, поэтому обнаруженную гетерогенность α -цепей авторы склонны считать скорее результатом посттрансляционных модификаций структуры α -цепей.

Молекулярная масса про- α -цепей проколлагена базальных мембран находится в пределах 140 000—185 000 дальтон [147, 152, 153]. Хотя ранее сообщалось, что проколлаген IV типа после выхода из клеток, подобно проколлагену I—III типов, превращается в коллаген [152], Минор и соавт. [154] показали, что в базальных мембранах такого превращения не происходит. Это, без сомнения, в значительной степени определяет особенности надмолекулярных структур. В частности, те же авторы отмечают отсутствие в базальных мембранах коллагеновых фибрилл с типичной поперечной исчерченностью.

Кроме коллагена I—IV типов, в тканях млекопитающих найдены и другие изоформы. Так, из оболочек плода человека выделены и охарактеризованы две разновидности α -цепей, которые назвали α A- и α B-цепями [111]. Они имеют типичное для α -цепей коллагена содержание иминокислот и глицина, но отличаются количеством аланина, основных аминокислот и некоторыми другими признаками. Предполагают, что в состав молекулы входят 2 α B-цепи и 1 α A-цепь.

α -Цепи, аминокислотный состав которых почти полностью соответствовал аминокислотному составу α A- и α B-цепей, за исключением содержания 3-оксипролина, были изолированы недавно из синовия, кожи эмбрионов и других тканей [109]. Их также обозначили α A- и α B-цепями. В обеих отмечается высокое содержание окисленных остатков лизина (соответственно 67 и 74%). Около $1/3$ остатков оксилизина гликозилировано. В отличие от околоплодных оболочек, где α A- и α B-цепи находятся в соотношении 1 : 2, в вышеуказанных тканях α A- и α B-цепи присутствуют в соотношении 1 : 1. Кроме того, в этих же тканях идентифицирован так называемый α C-компонент, который еще не охарактеризован в достаточной степени. Считалось, что все эти цепи входят только в состав коллагена базальных мембран, но то, что они найдены также в синовии — ткани, не содержащей базальных мембран, противоречит этому мнению [109].

Как известно, молекулы коллагена I типа можно диссоциировать на субъединицы, провести рекомбинацию $\alpha 1(1)$ - и $\alpha 2$ -цепей и получить искусственные молекулы типа $[\alpha 1(1)]_3$ и $(\alpha 2)_3$. При этом молекулы, состоящие из 3 $\alpha 2$ -цепей, гораздо менее устойчивы, чем $[\alpha 1(1)]_3$ -форма. Последняя же стабильностью структуры и способностью к фибриллообразованию *in vitro* очень схожа с нативными молекулами коллагена I типа [155]. Оказалось, что клетки соединительной ткани при определенных условиях синтезируют $[\alpha 1(1)]_3$ -форму коллагена. Впервые эта форма была идентифицирована в культурах хондроцитов [156], которые, как показано в многочисленных экспериментах, при культивировании в монослое теряют тканеспецифическую способность к синтезу коллагена II типа [157], синтезируя вместо этого коллаген I, III типов и $[\alpha 1(1)]_3$ -форму [158]. Кроме того, $[\alpha 1(1)]_3$ -форма найдена в культурах трансформированных фибробластов и опухолях [159—161]. Она выделена также из эмбриональных тканей цыпленка [162]; в тканях млекопитающих $\alpha 1(1)$ -тример пока не обнаружен. Предполагают, что синтез $\alpha 1(1)$ -тримера осуществляется недифференцированными соединительнотканскими клетками [162].

Таким образом, исследования последних лет, показавшие наличие в тканях генетически различных типов коллагена, позволяют по-новому подойти к решению проблем морфогенеза, органной специфичности соединительной ткани, ее изменения при различных патологических состояниях и старении. Появляется новая возможность исследовать генетические механизмы, лежащие в основе этих процессов.

Биологическое значение тканевой и возрастной гетерогенности коллагена окончательно не выяснено, однако показано, что при ряде заболеваний изменения внутритканевого спектра молекул коллагена обуславливают вполне определенные клинические проявления.

При некоторых аутоиммунных заболеваниях, в частности при ревматоидном артрите, коллаген может выступать в качестве аутоантигена.

Ограниченный объем данного обзора не позволяет остановиться на достижениях в изучении антигенных свойств изоколлагенов. По этой причине в статье не затронуты и вопросы регуляции обмена коллагена и др. Этот материал может составить содержание специальных обзоров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hay E. D. — *Am. Zool.*, 1973, v. 13, p. 1085.
2. Trelstad R. L. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1973, v. 21, p. 521.
3. Shorhan S., Cross J. — *Israel J. Med. Sci.*, 1974, v. 10, p. 537.
4. Reddi A. H. — In: *Biochemistry of Collagen*. Ed. G. N. Ramachandran, A. H. Reddi. New York, 1976, p. 449.
5. Никитин В. Н., Перский Е. Э., Утевская Л. А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. Киев, 1977.
6. Uitto J., Lichtenstein J. — *J. invest. Derm.*, 1976, v. 66, p. 59.
7. Kivirikko K. I., Risteli L. — *Med. et Biol.*, 1976, v. 54, p. 159.
8. LeRoy E. C. — *J. clin. Invest.*, 1974, v. 54, p. 880.
9. Лебедев Л. А. — *Вопр. мед. химии*, 1978, № 6, с. 789.
10. Chvapil M. — *Life Sci.*, 1975, v. 16, p. 1345.
11. Popper H. — In: *Collagen Metabolism in the Liver*. Ed. H. Popper, K. Becker. New York, 1975, p. 1.
12. McCullagh K. A., Balian G. — *Nature*, 1975, v. 258, p. 73.
13. Levene C., Murray J. — *Lancet*, 1977, v. 1, p. 628.
14. Risteli J., Koivisto V. A., Akerblom A. K. et al. — *Diabetes*, 1976, v. 25, p. 1066.
15. Хилькин А. М., Шехтер А. Б., Истратов Л. П. и др. Коллаген и его применение в медицине. М., 1976.
16. Коллагенопластика в медицине. Сыченков И. А., Лбоянц Р. К., Дронов А. Ф. и др. М., 1978.
17. Мазуров В. И. Биохимия коллагеновых белков. М., 1974.
18. Михайлов А. И. Коллаген кожного покрова и основы его переработки. М., 1971.
19. Feitzek P. P., Kuhn K. — *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, 1976, v. 7, p. 1.
20. Piez K. A. — In: *Biochemistry of Collagen*. Ed. G. N. Ramachandran, A. H. Reddi. New York, 1976, p. 1.
21. Prockop D. J., Berg R. A., Kivirikko K. I. et al. — *Ibid.*, p. 163.
22. Tanzer M. L. — *Ibid.*, p. 137.
23. Джаксон Д. С., Стевен Ф. С. — В кн.: *Современные биохимические и морфологические проблемы соединительной ткани*. Новосибирск, 1971, с. 13.
24. Gross J. — In: *Biochemistry of Collagen*. Ed. G. N. Ramachandran, A. H. Reddi. New York, 1976, p. 275.
25. Weis J. B. — *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, 1976, v. 7, p. 102.
26. Woessner J. F. — In: *Proteolysis and Physiological Regulation*. Ed. D. W. Ribbons, K. Brew. New York, 1976, p. 357.
27. Gries V. — In: *Connective Tissue: Biochemistry and Pathophysiology*. Ed. R. Fricke, F. Hartman. New York, 1974, p. 177.
28. Tuderman L., Kuutti E.-R., Kivirikko K. I. — *Europ. J. Biochem.*, 1975, v. 52, p. 9.
29. Kuutti E.-R., Tuderman L., Kivirikko K. I. — *Ibid.*, v. 57, p. 181.
30. Kivirikko K. I., Prockop D. U. — *J. biol. Chem.*, 1967, v. 242, p. 4007.
31. Risteli J., Tuderman L., Kivirikko K. I. — *Biochem. J.*, 1976, v. 158, p. 369.
32. Ryhänen L. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 438, p. 71.
33. Liu T. Z., Bhatnagar R. S. — *Fed. Proc.*, 1973, v. 32, p. 613.
34. Oppenheim B., Englard S. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 59, p. 710.
35. Tryggevason K., Risteli J., Kivirikko K. I. — *Ibid.*, 1977, v. 76, p. 275.
36. Risteli J., Truggvason K., Kivirikko K. I. — *Europ. J. Biochem.*, 1977, v. 73, p. 485.

37. Myllylä R., Risteli L., Kivirikko K. I. — Ibid., 1975, v. 52, p. 401.
38. Murray J. C., Cassell R. H., Pinnell S. R. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 481, p. 63.
39. Risteli L., Myllylä R., Kivirikko K. I. — Biochem. J., 1976, v. 155, p. 145.
40. Risteli L., Myllylä R., Kivirikko K. I. — Europ. J. Biochem., 1976, v. 67, p. 197.
41. Risteli L. — Biochem. J., 1978, v. 169, p. 189.
42. Spiro R. G., Spiro M. J. — J. biol. Chem., 1971, v. 246, p. 4899.
43. Henkel W., Buddecke E. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1975, Bd 356, S. 921.
44. Myllylä R., Anttinen H., Risteli L. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 480, p. 113.
45. Myllylä R., Risteli L., Kivirikko K. I. — Europ. J. Biochem., 1976, v. 61, p. 59.
46. Myllylä R. — Ibid., 1976, v. 70, p. 225.
47. Clark C. C., Kefalides N. A. — J. biol. Chem., 1978, v. 253, p. 47.
48. Kehn L. D., Isresky C., Zupnik J. et al. — Proc. natl. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 40.
49. Tuderman L., Kivirikko K. I., Prockop D. J. — Biochemistry (Wash.), 1978, v. 17, p. 2948.
50. Dukrin D., Davidson J. M., Bornstein P. — Arch. Biochem., 1978, v. 185, p. 326.
51. Uitto J. — Biochemistry (Wash.), 1977, v. 16, p. 3421.
52. Davidson J. M., McEneaney L. S. V., Bornstein P. — Europ. J. Biochem., 1977, v. 81, p. 349.
53. Siegel R. C., Fu C. C. — J. biol. Chem., 1976, v. 251, p. 5779.
54. Stassen F. L. H. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 438, p. 49.
55. Siegel R. C. — Proc. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 4826.
56. Harris E. D., Gonnerman W. A., Savage J. E. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 346, p. 332.
57. Narayanan A. S., Siegel R. M., Martin G. R. — Arch. Biochem., 1974, v. 162, p. 231.
58. Siegel R. C., Pinnell S. R., Martin G. R. — Biochemistry (Wash.), 1970, v. 9, p. 4486.
59. Chon W. S., Rucker R. B., Savage J. E. et al. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1970, v. 134, p. 1078.
60. Rucker R. B., O'Dell B. L. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 222, p. 527.
61. Page R. C., Benditt E. P. — Biochemistry (Wash.), 1967, v. 6, p. 1142.
62. Woolley D. E., Akzoyd C., Evanson J. M. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1978, v. 522, p. 205.
63. Woolley D. E., Glanville R. W., Roberts D. R. et al. — Biochem. J., 1978, v. 169, p. 265.
64. Woolley D. E., Tuoker J. S., Green G. et al. — Ibid., 1976, v. 153, p. 119.
65. Woolley D. E., Glanville R. W., Crossley M. J. et al. — Europ. J. Biochem., 1975, v. 54, p. 611.
66. McCroskery P. A., Richards J. F., Harris E. D. — Biochem. J., 1975, v. 157, p. 131.
67. Turto H., Lindy S., Uitto V.-J. et al. — Analyt. Biochem., 1977, v. 83, p. 557.
68. Werb Z., Reynolds J. J. — Biochem. J., 1975, v. 151, p. 645.
69. Louise S. J., Jeffrey J. J., Eisen A. Z. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 485, p. 179.
70. Berman M. B., Banade R. — Ann. Ophthal., 1973, v. 5, p. 1193.
71. Murphy G., Cartwright E. C., Sellers A. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 483, p. 493.
72. Sellers A., Reynolds J. J. — Biochem. J., 1977, v. 167, p. 353.
73. Lindner J., Grasedyck K., Prinz G. et al. — In: Connective Tissue: Biochemistry and Pathophysiology. Ed. R. Fricke, F. Hartman. New York, 1974, p. 180.
74. Starkey P. M., Barrett A. J., Burleigh M. C. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 483, p. 386.
75. Scott P. G., Paerson C. H. — FEBS Letters, 1978, v. 88, p. 41.
76. Morgan P. H., Jacobs H. G., Segrest J. P. et al. — J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 5042.
77. Toole B. P., Kang A. H., Trelstad R. L. et al. — Biochem. J., 1972, v. 127, p. 715.
78. Miller E. J. — Biochemistry (Wash.), 1971, v. 10, p. 1652.
79. Volpin D., Veis A. — Ibid., 1973, v. 12, p. 1452.
80. Gallop P. M., Blumenfeld O. O., Seifter S. — Ann. Rev. Biochem., 1972, v. 41, p. 617.
81. Zimmermann B. K., Timpl R., Kuhn K. — Europ. J. Biochem., 1976, v. 35, p. 216.
82. Eyre D. R., Glincher M. J. — Biochem. J., 1973, v. 135, p. 393.
83. Vater C. A., Mainardi C. L., Harris E. D., Jr. — Biochim. biophys. Acta, 1978, v. 539, p. 238.
84. Hulmes D. J. S., Miller A., Parry D. A. D. et al. — J. molec. Biol., 1973, v. 79, p. 137.
85. Smith J. W. — Nature, 1968, v. 219, p. 157.

86. *Veis A., Schlueter R. J.* — Ibid., 1967, v. 215, p. 931.
87. *Robert L., Robert B.* — In: *Connective Tissue: Biochemistry and Pathophysiology*. Ed. R. Fricke, F. Hartman. New York, 1974, p. 240.
88. *Vaes G., Eeckhout Y.* — In: *Dynamics of Connective Tissue Macromolecules*. Ed. P. M. Burleigh, A. R. Poole. Amsterdam, 1975, p. 129.
89. *Dayer J.-M., Krane S. M., Russell P. G. G. et al.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, p. 945.
90. *Werb Z., Mainardi C. L., Vater C. A. et al.* — *New Engl. J. Med.*, 1977, v. 296, p. 1017.
91. *Harris E. D., Jr., Vater C. A., Mainardi C. L. et al.* — *Agents a Actions*, 1978, v. 8, p. 36.
92. *Reynolds J. J., Sellers A., Murphy G. et al.* — *Lancet*, 1977, v. 13, p. 333.
93. *Nagai Y.* — *Molec. Cell. Biochem.*, 1973, v. 1, p. 137.
94. *Kawamoto T., Nagai Y.* — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 437, p. 190.
95. *Sellers A., Cartwright E., Murphy G. et al.* — *Biochem. J.*, 1977, v. 163, p. 303.
96. *Kuettner K. E., Hiti J., Eisenstein R. et al.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 72, p. 40.
97. *Bauer E. A., Stricklin G. P., Jeffrey J. J. et al.* — Ibid., 1975, v. 64, p. 232.
98. *Stricklin G. P., Bauer E. A., Jeffrey J. J. et al.* — *Biochemistry (Wash.)*, 1977, v. 16, p. 1607.
99. *Shinkai H., Kawamoto T., Hory H. et al.* — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1977, v. 81, p. 261.
100. *Nagai Y., Shinkai H., Ninomiya Y.* — *Proc. Jap. Acad.*, 1978, v. 54, Ser. B., N 3, p. 140.
101. *Miller E. J.* — *Molec. Cell. Biochem.*, 1976, v. 13, p. 165.
102. *Miller E. J., Harris E. D., Jr., Chung E. et al.* — *Biochemistry (Wash.)*, 1976, v. 15, p. 787.
103. *Horwitz A. L., Hance A. J., Crystal R. G.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 897.
104. *Woolley D. E., Lindberg K. E., Glanville R. W. et al.* — *Europ. J. Biochem.*, 1975, v. 50, p. 437.
105. *The Joint and Synovial Fluid*. Ed. L. Solkoff. New York, 1978.
106. *Evans P. E., Etherington D. J.* — *Europ. J. Biochem.*, 1978, v. 83, p. 87.
107. *Etherington D. J.* — *Connect. Tissue Res.*, 1977, v. 5, p. 135; — *Biochem. J.*, 1974, v. 137, p. 547.
108. *Binekowski R. S., Cowan M. J., McDonald J. A. et al.* — *J. biol. Chem.*, 1978, v. 253, p. 4356.
109. *Brown R. A., Shuttleworth C. A., Weiss J. B.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1978, v. 80, p. 866.
110. *Jimenez S. A., Yankowski R., Bashey R. I.* — Ibid., v. 81, p. 1298.
111. *Burgeson R. E., Eladli F. A., Kaitila I. I. et al.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, p. 2579.
112. *Piez K. A., Lewis M. S., Martin G. R. et al.* — *Biochim. biophys. Acta*, 1961, v. 53, p. 596.
113. *Sykes B., Solomon E.* — *Nature*, 1978, v. 272, p. 548.
114. *Miller E. J., Matukas V. J.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1969, v. 64, p. 1264.
115. *Butler W. T., Miller E. J., Finch E. J., Jr.* — *Biochemistry (Wash.)*, 1976, v. 13, p. 3000.
116. *Butler W. T., Miller E. J.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 57, p. 190.
117. *Butler W. T., Finch E. J., Jr., Miller E. J.* — *J. biol. Chem.*, 1977, v. 252, p. 639.
118. *Timpl R., Wick G., Gay S.* — *J. Immunol. Meth.*, 1977, v. 18, p. 165.
119. *Freeman J. L.* — *Invest. Ophthal.*, 1978, v. 17, p. 171.
120. *Miller E. J., Epstein E. H., Jr., Piez K. A.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1971, v. 42, p. 1024.
121. *Chung E., Miller E. J.* — *Science*, 1974, v. 183, p. 1200.
122. *Chung E., Keele E. M., Miller E. J.* — *Biochemistry (Wash.)*, 1974, v. 13, p. 3459.
123. *Epstein E. H., Jr.* — *J. biol. Chem.*, 1974, v. 249, p. 3225.
124. *Fietzek P. P., Allman H., Rauterberg J. et al.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 84.
125. *Seyer J. M., Kang A. H.* — *Biochemistry (Wash.)*, 1977, v. 16, p. 1158.
126. *Glanville R. W., Fietzek P. P.* — *Analyt. Biochem.*, 1977, v. 80, p. 382.
127. *Timpl R., Glanville R. W., Nowack H. et al.* — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1975, Bd 356, S. 1783.
128. *Wiedemann H., Chiung E., Fujii T. et al.* — *Europ. J. Biochem.*, 1975, v. 51, p. 363.
129. *Stark M., Miller E. J., Kühn K.* — Ibid., 1972, v. 27, p. 192.
130. *Trelstad R. L., Kang A. H., Igarashi S. et al.* — *Biochemistry (Wash.)*, 1970, v. 9, p. 4993.
131. *Fleischmajer R., Gay S., Meigel W. N. et al.* — *Arthr. a. Rheum.*, 1978, v. 21, p. 418.

132. Miller E. J., Finch J. E., Jr., Chung E. et al. — Arch. Biochem., 1976, v. 173, p. 631.
133. Wang H.-M., Chan J., Pettigrew D. W. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1978, v. 533, p. 270.
134. Keski-Oja J. — FEBS Letters, 1976, v. 71, p. 325.
135. Jilek F., Hörmann H. — Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, Bd 359, S. 247.
136. Hugues J., Herion F., Husgens F. et al. — Thrombos Res., 1976, v. 9, p. 223.
137. Barnes M. J., Gordon J. L., McIntyre D. E. — Biochem. J., 1976, v. 160, p. 647.
138. Epstein E. H., Jr., Munderloh N. H. — J. biol. Chem., 1978, v. 253, p. 1336.
139. Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. — Acta derm.-venereol. (Stockh.), 1978, v. 58, p. 111.
140. Weber L., Meigel W. N., Spier W. — Arch. derm. Forsch., 1978, Bd 261, S. 63.
141. Kefalides N. A. — Biochim. biophys. Res. Commun., 1971, v. 45, p. 226.
142. Daniels J. R., Hsiao Chu G. — J. biol. Chem., 1975, v. 250, p. 3531.
143. Kefalides N. A., Denduchis B. — Biochemistry (Wash.), 1969, v. 8, p. 4613.
144. Schwartz D., Veis A. — FEBS Letters, 1978, v. 85, p. 326.
145. Kefalides N. A. — Int. Rev. Connect. Tissue Res., 1973, v. 6, p. 63.
146. Tryggvason K. Acta Univ. Oul., A-57, 1977, Biochem. 17. Ristely L., Acta see N°41.
147. Orkin R. W., Gehron P., McGoodwin E. B. et al. — J. exp. Med., 1977, v. 145, p. 204.
148. Chung E., Rhodes R. K., Miller E. J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, v. 71, p. 1167.
149. Sato T., Spiro R. G. — J. biol. Chem., 1976, v. 251, p. 4062.
150. Freytag J. W., Ohno M., Hudson B. G. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, v. 72, p. 796.
151. Timpl R., Martin G. R., Bruckner P. et al. — Europ. J. Biochem., 1978, v. 84, p. 43.
152. Grant M. E., Harwood R., Williams I. F. — Ibid., 1975, v. 54, p. 531.
153. Kefalides N. A., Cameron J. D., Tomiccek E. A. et al. — J. biol. Chem., 1976, v. 251, p. 730.
154. Minor R. R., Clark C. C., Strause E. L. et al. — Ibid., 1976, v. 251, p. 1789.
155. Tkocz C., Kühn K. — Europ. J. Biochem., 1969, v. 7, p. 454.
156. Mayne R., Vail M. S., Miller E. J. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 4511.
157. Deshmukh K., Sawyer B. D. — FEBS Letters, 1978, v. 89, p. 230.
158. Benya P. D., Padilla S. R., Nimni M. E. — Biochemistry (Wash.), 1977, v. 16, p. 865.
159. Hata R. I., Peterkofsky B. — J. Cell. Physiol., 1978, v. 95, p. 343.
160. Little Ch. D., Church R. L., Miller R. A. et al. — Cell, 1977, v. 10, p. 287.
161. Moro L., Smith B. D. — Arch. Biochem., 1977, v. 182, p. 33.
162. Jimenez S. A., Bashey R. I. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1977, v. 78, p. 1354.
163. Kivirikko K. I., Prockop D. J. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 258, p. 366.
164. Robins S. P., Bailey A. J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1972, v. 47, p. 76.
165. Tanzer M. L., Fairweather R., Gallop P. M. — Arch. Biochem., 1972, v. 151, p. 137.
166. Yonemasu K., Stroud M., Niedermeier W. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1971, v. 43, p. 1388.
167. Lwebuga-Mukasa J. S., Lappi S., Taylor P. — Biochemistry (Wash.), 1976, v. 15, p. 1425.

Поступила 26/1 1979 г.

MODERN CONCEPTS ON METABOLISM AND GENETIC POLYMORPHISM OF COLLAGEN

W. A. Wladimirtsev, D. A. Lebedev

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

The data on structure, biosynthesis, post-synthetic modifications, extracellular development and degradation of collagen are briefly reviewed. Role of main enzymes, participating in collagen turnover, is discussed. Isoforms of the protein are considered in details. The importance of studies on collagen proteins is noted in connection with investigations on morphogenesis, cell differentiation, regeneration.

А. И. Жихарева

ВЛИЯНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ НА ФОСФОЛИПИДЫ ПЕЧЕНИ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Тюменского медицинского института

Уровень свободных фосфолипидов в норме в разных тканях достаточно стабилен [1]. Однако содержание фосфолипидов при реакциях напряжения подвержено значительным колебаниям [2]. Оказывая влияние на ряд ферментативных процессов, фосфолипиды в свою очередь могут изменять состояние биохимических механизмов, обеспечивающих адаптивные процессы. Закономерности изменения фосфолипидного состава печени при некоторых экстремальных воздействиях, в частности при изменении параметров окружающей среды в естественных пределах (температуры воздуха, влажности, давления и т. д.), до сих пор не раскрыты. Цель настоящего исследования — изучение фосфолипидного спектра печени крыс при действии низких температур.

Методика

Исследование выполнено на белых беспородных крысах-самцах в возрасте 5 мес. Влияние низких температур изучали на 3 сериях опытов. В I серии осуществляли одномоментное охлаждение. С этой целью крыс помещали в ванну с холодной водой (4°C) на 2 мин. Во II серии опытов крысы находились в воде температуры 17°C в течение 15 мин (время воздействия низких температур ограничивалось тем, что при продолжении опыта животные тонули). В III серии опытов крыс содержали 24 ч при температуре воздуха 6°C. В каждой серии опытов использовано по 6—8 животных. Контролем служили интактные крысы. По окончании опыта у крыс под эфирным наркозом отбирали пробы крови и печени. Фосфолипидные фракции в ткани печени определяли методом тонкослойной хроматографии [3] на пластинках «силуфол» [4]. В системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4) обнаруживалось до 8 фракций, идентифицированных от наиболее подвижной: фосфатидные кислоты; кардиолипины; фосфатидилэтаноламин; фосфатидилхолин; сфингомиелин; фосфатидилсерин; монофосфоинозитид; лизолецитины. В качестве свидетелей использовали индивидуальные фракции фосфолипидов, выделенные из бычьего мозга [5]. Минерализацию липидного фосфора производили по модифицированному методу В. С. Родионова [6], о количестве фосфолипидов во фракциях судили по содержанию неорганического фосфора который определяли методом Е. К. Алимовой [7].

Результаты и обсуждение

При одномоментном охлаждении содержание общих фосфолипидов в печени возрастало до 1232 мкг неорганического фосфора на 1 г ткани печени. Изменения отдельных фракций были неоднозначны. Так, содержание фосфатидных кислот, кардиолипина, фосфатидилэтанолamina и фосфатидилсерина достоверно снизилось в 1,3; 1,4; 1,2 и 1,4 раза соответственно. Уровень сфингомиелина повысился в 1,5 раза, а количество фосфатидилхолина и лизолецитинов не отличалось от контрольных данных (табл. 1). Кроме того, у крыс, подвергавшихся охлаждению, обнаруживалась фракция, идентифицированная как монофосфоинозитид, которая отсутствует у контрольных животных.

При кратковременном охлаждении крыс общее содержание фосфолипидов в печени снижалось. Содержание отдельных фракций, в частности фосфатидилхолина и лизолецитина, уменьшалось на 36 и 27 %, уровень фосфатидных кислот, фосфатидилэтанолamina, сфингомиелина и фосфатидилсерина не изменился, а содержание кардиолипина возросло почти на 20 % (табл. 2). Как и при одномоментном охлаждении, в этом опыте обнаруживается монофосфоинозитид.

Длительное охлаждение животных сопровождалось более отчетливой реакцией со стороны индивидуальных фосфолипидов. Количество фосфатид-

Т а б л и ц а 1

Изменение содержания фосфолипидных фракций в печени после одномоментного охлаждения (в мкг Р_н на 1 г ткани)

Условия опыта	Фосфатидные кислоты	Кардиолипин	Фосфатидил-этаноламин	Фосфатидил-холин	Сфингомиелин	Фосфатидил-серин	Монофосфоинозитид	Лизолецитин
Контроль	86,0±4,9 (8)	87,5±4,0 (8)	160,0±7,9 (8)	550,0±11,5 (8)	74,5±5,4 (8)	80,0±6,1 (8)	—	132±16,8 (8)
Одномоментное охлаждение	68,0±3,6* (7)	63,5±4,5* (7)	139,0±2,0* (6)	568,0±6,2 (7)	111,0±2,9* (8)	60,0±7,0* (7)	97,0±7,5 (7)	126,0±9,6 (7)

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках указано число опытов. Звездочкой отмечены достоверные изменения по сравнению с контролем ($P < 0,05$).

Т а б л и ц а 2

Изменение содержания фосфолипидных фракций в печени после кратковременного охлаждения (в мкг Р_н на 1 г печени)

Условия опыта	Фосфатидные кислоты	Кардиолипин	Фосфатидил-этаноламин	Фосфатидил-холин	Сфингомиелин	Фосфатидилсерин	Монофосфоинозитид	Лизолецитин
Контроль	85,0±7,4 (8)	84,0±5,1 (8)	169,0±7,0 (8)	523,0±11,9 (8)	81,0±5,0 (8)	85,0±10,5 (8)	—	143,0±5,2 (8)
Кратковременное охлаждение	85,0±3,8 (6)	104,0±4,8* (6)	160,0±2,60 (6)	336,0±4,1* (6)	89,0±3,20 (6)	97,0±4,1 (6)	73,0±4,6 (6)	104,0±5,6* (6)

ных кислот, кардиолипина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и лизолецитина увеличилось соответственно в 1,3; 1,9; 1,5; 1,3 и 1,4 раза. Уровень фосфатидилхолина, напротив, снизился в 1,3 раза, а сфингомиелина не отличался от контрольных значений. В итоге общее количество фосфолипидов увеличилось почти на 12% (табл. 3). Наличие монофосфоинозотида отмечено и в данном случае.

Лабильность фосфатидных кислот и кардиолипина связана с тем, что эти фракции, отличаясь высокой степенью метаболической активности, весьма чувствительны к различным воздействиям [1], в том числе, по-видимому, и к влиянию низких температур. Появление монофосфоинозотида у подопытных животных, вероятно, является свидетельством выраженной

Т а б л и ц а 3

Изменение содержания фосфолипидных фракций в печени после длительного охлаждения крыс (в мкг Р_н на 1 г печени)

Условия опыта	Фосфатидные кислоты	Кардиолипин	Фосфатидил-этаноламин	Фосфатидил-холин
Контроль	86,0±7,5 (6)	80,0±5,0 (6)	165,0±6,5 (6)	550,0±5,0 (8)
Длительное охлаждение	108,0±4,8* (8)	152,0±10,8* (8)	248,0±19,0* (8)	425,0±15,0* (8)

Продолжение

Условия опыта	Сфинго-миелин	Фосфатидилсерин	Монофосфоинозитид	Лизолецитин
Контроль	80,0±4,80 (8)	80,0±7,0 (8)	—	100,0±5,2 (8)
Длительное охлаждение	91,0±3,3 (8)	101,0±5,0* (8)	70,0±0,0 (8)	144,0±6,7 (6)

реакции организма на охлаждение, поскольку высокая степень реактивности этой фракции в обменных процессах при различных функциональных состояниях организма известна [1]. Снижение уровня фосфолипидов в печени при кратковременном охлаждении, возможно, свидетельствует об усилении обмена веществ в этом случае. Заметное повышение содержания фосфолипидов при одномоментном и длительном охлаждении свидетельствует об активно протекающих процессах синтеза фосфатидов в печени.

Обнаруженные изменения, по-видимому, носят адаптивный характер: усиление интенсивности синтеза фосфолипидов выявлено у животных и при других экстремальных воздействиях [1, 8, 9] и гипотермии [10]. Повышенная продукция фосфатидных кислот, кардиолипина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина при длительном охлаждении может быть связана с реакцией на длительное раздражение холодом, а также с включением гормональных механизмов, обеспечивающих гомеостаз.

Автор выражает глубокую благодарность проф. А. Ш. Бышевскому за ценные советы при выполнении работы.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Карагезян К. Г. Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. Ереван, 1972.
2. Ганелина И. Е., Кривская В. Ю., Смирнов А. А. и др. — В кн.: Система свертывания крови при некоторых физиологических и патологических состояниях. М.—Л., с. 85—98.
3. Алимова Е. К., Аствацатурьян А. Г. Исследование жирных кислот и липидов методом хроматографии. М., 1967.

4. Жихарева А. И., Забокрицкая Е. П. — В кн.: Хроматографические и электрофоретические методы исследования биологически активных соединений. Свердловск, 1976, с. 47.
5. Бышевский А. И., Мухачева И. А. — Биохимия, 1976, т. 41, № 3, с. 543.
6. Родионов В. С., Тюпина К. А., Захарова Л. С. — Там же, 1974, т. 39, № 1, с. 215.
7. Алимова Е. К. — Лабор. дело, 1964, № 6, с. 346.
8. Angiolini V., Aresu R., Ziguori G. — Boll. Soc. ital. Biol. Sper., 1967, v. 43, p. 1148.
9. Fiorentini M., Gaeta H., Leotto R. — Ibid., 1968, v. 44, p. 873.
10. Серебренникова Э. Г., Векслер Я. И. — Укр. біохіміч. Ж., 1977, № 2, с. 16.

Поступила 17/1 1979 г.

EFFECT OF COOLING ON LIVER PHOSPHOLIPIDS

A. I. Zhikhareva

Central Research Laboratory, Medical School, Tyumen

Phospholipid composition of rat liver tissue was distinctly altered in cooling. Single-term cooling caused a decrease in content of phosphatidic acids, cardiolipin, phosphatidyl diethanolamine, phosphatidyl serine but it increased the sphingomyelin level. Content of phosphatidyl choline and of lysolecithins was markedly decreased in short-term cooling. Prolonged cooling was accompanied by an increase in content of all the phospholipid fractions except of phosphatidyl choline. Appearance of monophosphoinositide in the phospholipid spectrum under all the conditions studied reflect the response of the organism to a stressing influence of cooling.

УДК 612.822.1-06:612.273.2

Т. П. Жукова, Е. Г. Сорокина, Ю. Г. Попандопуло

ПОСТГИПОКСИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБМЕНА РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ МОЗГА

Научно-исследовательский институт педиатрии АМН СССР, Москва

Не вызывает сомнений факт, что гипоксия плода и новорожденного способна тяжело нарушить последующее развитие ребенка, особенно его мозга. Клинические наблюдения свидетельствуют об особой важности постгипоксического периода. В предыдущих экспериментальных исследованиях было показано, что острая гипоксия плода или новорожденного влечет за собой длительно текущий патологический процесс, в котором можно различить несколько стадий. По-видимому, особое значение имеет стадия, которая наступает вслед за острой гипоксией и характеризуется, с одной стороны, расстройством мозгового кровообращения, с другой — глубокими нарушениями процессов роста и дифференцировки клеточных элементов головного и спинного мозга [1—3]. Именно эта стадия совпадает с наиболее ответственным периодом постнатального созревания организма, особенно его мозга. Морфологические изменения со стороны сосудистой системы мозга свидетельствуют о состоянии хронической гипоксии в этот период, а состояние паренхиматозных элементов нервной ткани говорит о глубоких расстройствах ее трофики, в первую очередь пластических процессов. Эти два типа изменений и определили направление наших дальнейших исследований, а именно предполагалось изучить состояние энергетического обмена на разных сроках после гипоксии и содержание свободных аминокислот в ткани мозга, что могло бы явиться косвенной характеристикой обмена белков и некоторых медиаторов. Действие гипоксии на богатые энергией соединения в мозговой ткани многократно исследовалось на взрослых животных [4—8]. Было показано, что заметное падение содержания АТФ наблюдается лишь в случае глубокой депрессии электрической активности мозга [9]. Высказывается мнение, что смерть в условиях аноксии наступает не в результате истощения богатых энергией соединений, а от неспособности ткани мозга их использовать [10]. Установлено также, что гипоксия дей-

ствует на энергетический обмен мозга молодых животных в меньшей мере, чем на те же соединения мозга взрослого организма [1—3, 5, 11, 12].

Так, по данным [12], через 4 мин после полной ишемии мозга содержание АТФ у новорожденных мышей все еще составляет 70% от исходного уровня, тогда как в нервной ткани взрослых мышей оно падает почти до нуля. Более длительное выживание новорожденных в условиях гипоксии объясняют медленной скоростью процессов метаболизма и утилизации богатых энергией соединений. Эти особенности обмена адениннуклеотидов у новорожденных перекликаются с данными о различных путях использования энергии в созревающем и уже зрелом мозге. В частности, это касается и активности АТФ-азы. Активность АТФ-аз обнаруживается в нервной ткани незрелорождающихся животных к концу внутриутробного развития. При этом участие Na, K-стимулируемой АТФ-азы в обеспечении энергией «натриевого насоса» начинает выявляться лишь с момента структурного и функционального созревания нейронов.

По данным [13], застойная гипоксия у молодых крыс разного возраста по-разному влияет на активность АТФ-азы. Следовательно, и в этом отношении адаптивные реакции метаболизма незрелой ткани мозга в ответ на гипоксию отличаются от соответствующих реакций взрослого организма.

В приведенных работах речь шла об острой гипоксии. Изучение восстановительного периода, как правило, ограничивалось ближайшими сроками после гипоксии — от 1 до 24 ч. В то же время проведенные ранее морфологические и биохимические исследования постгипоксических изменений нервной ткани животных дали основание предположить сохранение нарушений энергетического обмена мозга в отдаленные сроки постгипоксической энцефалопатии. В связи с этим было изучено содержание адениннуклеотидов, лактата, гликогена, свободных аминокислот, а также активность АТФ-аз в ткани мозга животных, перенесших внутриутробную гипоксию.

Методика

Работа выполнена на белых крысах линии Вистар. Асфиксию вызывали по разработанному ранее методу путем временного пережатия сосудов пуповины плода на 18—19-й день внутриутробного развития [14]. После восстановления кровотока по сосудам пуповины матка возвращалась в брюшную полость, рана зашивалась. Крысы доношивали беременность и родили в срок. Мозговую ткань крысят, перенесших асфиксию, исследовали в разные сроки постнатального развития — от 1 дня до 5 мес. Часть плодов была исследована в конце острой асфиксии, через 3 сут после нее. Всего было обследовано 142 контрольные крысы, 105 животных подвергнутых асфиксии и 30 плодов последней трети внутриутробного развития. Сразу после декантации и быстрого удаления кожных покровов и костей черепа срезы коры в одних и тех же областях во всех случаях замораживали жидким азотом или твердой углекислотой. Пробы ткани взвешивали в замороженном состоянии. Все три адениннуклеотида определяли в одном хлорнокислом фильтрате по методу Адама [15]. Конечная концентрация ткани — не ниже 25 мг в 1 мл фильтрата. Содержание лактата находили по методу Хохорста [16] также в хлорнокислом фильтрате при концентрации ткани 20—40 мг в 1 мл фильтрата. Результаты выражали в микромолях на 1 г свежей массы ткани. Количество гликогена в ткани мозга устанавливали по методу Дюбуа [17], результаты выражали в миллиграммах на 100 г свежей массы ткани. Активность АТФ-аз определяли по накоплению в ходе реакции неорганического фосфора. Навеску замороженной твердой углекислотой ткани (около 50 мг в 1 мл гомогената) гомогенизировали в охлажденном растворе дезоксихолата натрия (в концентрации 0,6 мг/мл). Инкубацию проводили в среде, содержащей 3 мМ АТФ-Na₂; 5 мМ MgCl₂; 100 мМ NaCl; 20 мМ KCl; 50 мМ трис-HCl; 32 мМ сахарозы.

Активность Na, K-зависимой АТФ-азы находили по разности между активностью общей и Mg-зависимой АТФ-азы. Для определения Mg-зависимой АТФ-азы в среду вместо NaCl и KCl добавляли 80 мМ трис-HCl. Время инкубации 10 мин при 37°C [18, 19].

Неорганический фосфор определяли спектрофотометрически по методу Лоури при 700 нм [20]. Активность АТФ-аз выражали в микромолях неорганического фосфора на 1 мг белка в 1 мин.

Энергетический заряд системы вычисляли по формуле Аткинсона [21]:

$$\frac{\text{АТФ} + 0,5 \text{ АДФ}}{\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}}.$$

Содержание белка в гомогенате находили по методу Лоури; в качестве стандарта использовали кристаллический бычий сывороточный альбумин. Содержание 14 свободных аминокислот в экстрактах сульфосалициловой кислоты определяли на аминокислотном анализаторе. Результат выражали в микромолях на 1 г свежей массы ткани мозга. Результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

К концу острой асфиксии (через 18—33 мин) при падении частоты сердечных сокращений до 45—50 в минуту суммарное содержание адениннуклеотидов в мозговой ткани больших полушарий изменилось незначительно (на 12%; рис. 1). В то же время количество АТФ упало на 38% ($1,796 \pm 0,0049$ в контроле, $1,107 \pm 0,058$ в опыте; $P < 0,001$) при одновременном увеличении АДФ на 103% ($0,3139 \pm 0,005$ в контроле, $0,6381 \pm 0,06$ в опыте; $P < 0,01$) и АМФ на 20% ($0,2602 \pm 0,018$ в контроле, $0,3132 \pm 0,021$ в опыте; $P < 0,01$) по сравнению с плодами того же возраста, не подвергавшимися воздействию.

В результате изменения соотношения отдельных нуклеотидов изменился и энергетический заряд системы — до 0,69 вместо 0,83 в контроле (рис. 2). Одновременно резко возросла активность гликолитических процессов, о чем свидетельствовали накопление молочной кислоты (100—500%) (рис. 3) и повышение активности ЛДГ. Содержание гликогена в большинстве случаев несколько падало (рис. 4). Во время острой гипоксии гликолитическая генерация АТФ после утилизации оставшегося кислорода оказалась недостаточной для покрытия ее расхода (соотношение АТФ/АДФ падало).

Снижение активности АТФ-аз (рис. 5), наблюдавшееся в этот период (Na, K-зависимая АТФ-аза с $0,046 \pm 0,0033$ в контроле до $0,0297 \pm 0,0022$ в опыте; $P < 0,001$; Mg-зависимая АТФ-аза с $0,03212 \pm 0,0008$ в контроле до $0,0221 \pm 0,0022$ в опыте; $P < 0,01$), может рассматриваться как компенсаторная реакция, уменьшающая гидролиз АТФ. Через 3 сут после гипоксии сохранялось сниженное содержание АТФ и повышенное количество лактата в мозговой ткани подопытных плодов. Все еще высокой оставалась активность ЛДГ. Активность АТФ-аз проявляла тенденцию к нормализации, но не достигла контрольного уровня.

Акт рождения как у подопытных, так и у контрольных животных вызывал сдвиги в энергетическом обмене мозговой ткани, свидетельствующие о переживании плодом состояния гипоксии. Однако у плодов, перенесших незадолго до рождения острую кислородную недостаточность, эти изменения были выражены значительно резче. Наряду с достоверным снижением суммарного количества адениннуклеотидов главным образом за счет АТФ ($1,939 \pm 0,038$ в контроле, $1,632 \pm 0,025$ в опыте; $P < 0,01$) наблюдались увеличение содержания молочной кислоты на 50—300% ($4,547 \pm 0,413$ в контроле, $17,954 \pm 0,836$ в опыте; $P < 0,01$) и повышение активности ЛДГ. Содержание гликогена уменьшалось на 35—50% ($184 \pm 7,86$ в контроле, $108,92 \pm 19,63$ в опыте; $P < 0,01$). Активность АТФ-аз была выше, чем у подопытных плодов перед рождением, но ниже, чем в контроле. Одновременно изменялось содержание свободных аминокислот: у подопытных животных повышалось содержание незаменимых аминокислот (фенилаланина на 114%, гистидина на 83%, лейцина на 32%) и уменьшалось содержание «активных» заменимых аминокислот (треонина на 42,7%, глутаминовой кислоты на 28%; рис. 6). Увеличение содержания незаменимых аминокислот, используемых преимущественно в синтезе белка, могло явиться отражением деструктивных процессов в мозге, усиливающихся в период родов. В последующие дни жизни, охватывающие постгипоксическую стадию нарушения мозгового кровообращения (первые $1\frac{1}{2}$ —2 нед жизни), наблюдалось постепенное нарастание аденилатного фонда мозговой ткани подопытных животных, повышение активности АТФ-аз, нормализация содержания молочной кислоты и увеличение количества гликогена, которое превышало контрольный уровень (см. рис. 1—6). В этот же период в основном сохранялась выяв-

ленная у новорожденных направленность изменений в пуле свободных аминокислот, что может свидетельствовать либо о превалировании деструктивных процессов в нервной ткани над процессами синтеза, либо о нарушении

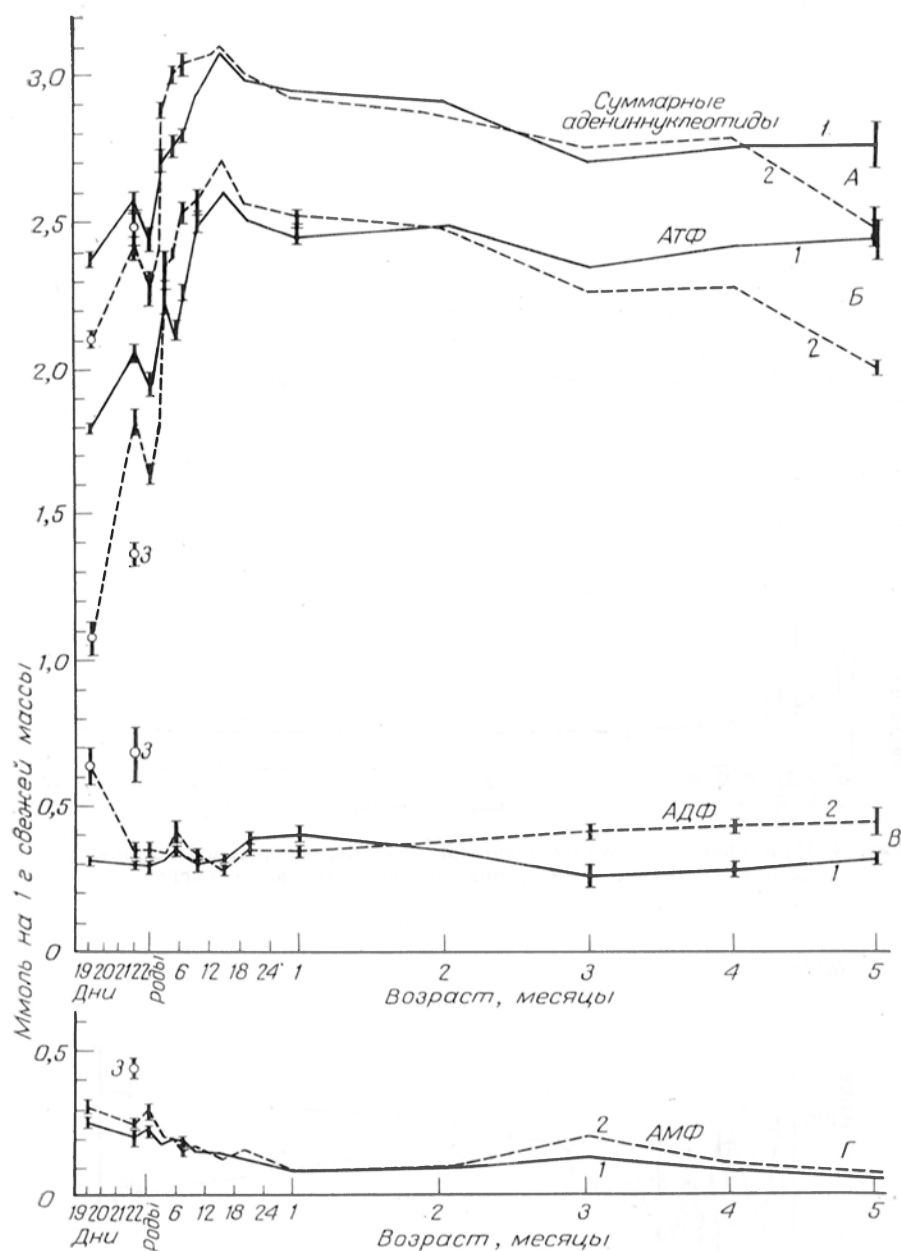


Рис. 1. Содержание адениловых нуклеотидов в мозговой ткани крыс разного возраста, перенесших интранатальную гипоксию.

Здесь и на рис. 2—5 1 — контроль; 2 — после интранатальной гипоксии; 3 — острая гипоксия. А — суммарные нуклеотиды; Б — АТФ; В — АДФ; Г — АМФ. Представлены средние арифметические величины. Ошибки средних арифметических (вертикальные линии) приведены в тех случаях, когда $P > 0,01$.

активного транспорта отдельных аминокислот через гематоэнцефалический барьер.

К 1½ мес жизни различия между подопытными и контрольными животными сглаживались. Однако сохранялись более низкий уровень ак-

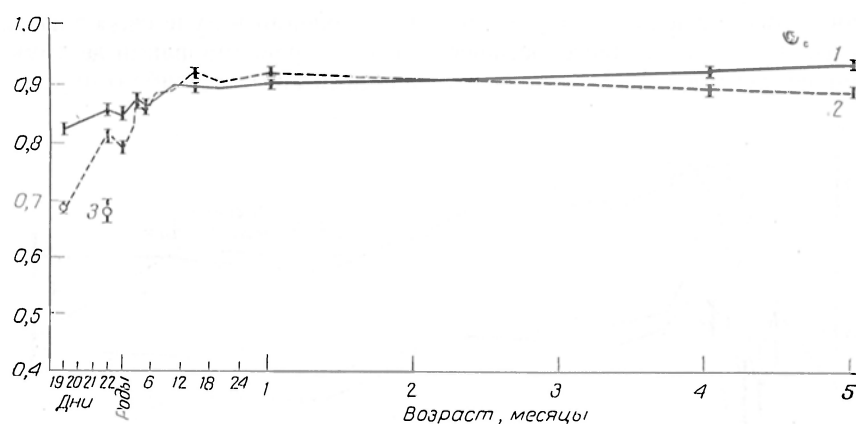


Рис. 2. Изменение энергетического заряда системы для мозговой ткани крыс разного возраста, перенесших интранатальную гипоксию.

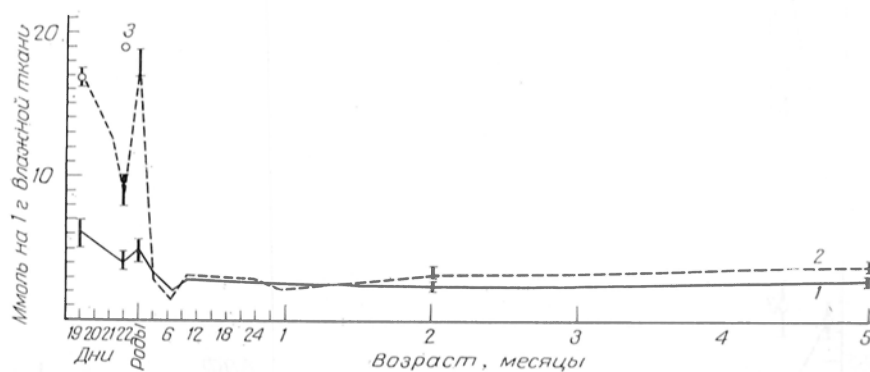


Рис. 3. Изменение содержания молочной кислоты в мозговой ткани крыс разного возраста, перенесших интранатальную гипоксию.

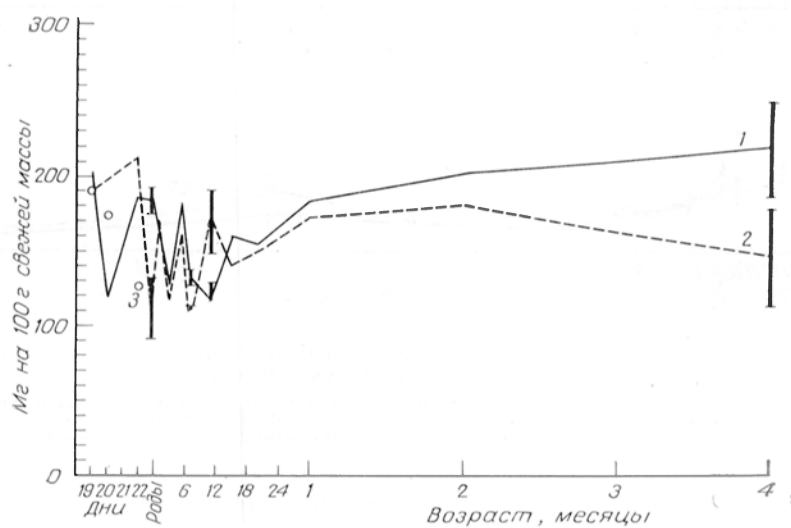


Рис. 4. Изменение содержания гликогена в мозговой ткани крыс разного возраста, перенесших интранатальную гипоксию.

тивности Mg-зависимой АТФ-азы ($0,1647 \pm 0,0087$ в контроле, $0,1549 \pm 0,0026$ в опыте; $P < 0,001$) и повышенное содержание АТФ ($2,454 \pm 0,0296$ в контроле, $2,511 \pm 0,0361$ в опыте; $P < 0,02$). В этом возрасте содержание гликогена не поднималось выше нижних границ контрольных величин.

После 2-месячного возраста наблюдалось стойкое снижение всех показателей энергообеспечения мозговой ткани больших полушарий головного мозга крыс, перенесших острую кислородную недостаточность в интранатальном периоде. Эти изменения прогрессировали. Одновременно возрастало количество неорганического фосфора, увеличивалось содержание молочной кислоты, возрастала активность ЛДГ и падала активность окислитель-

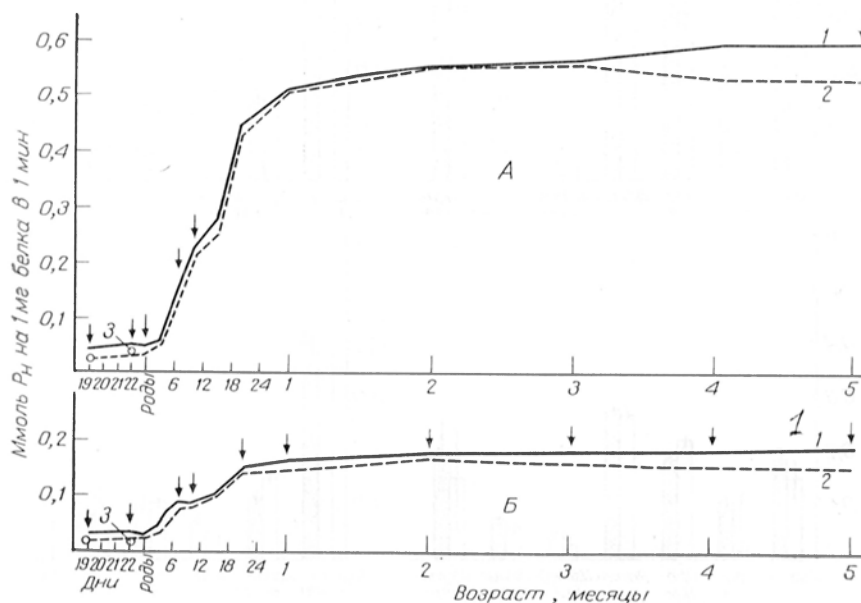


Рис. 5. Изменение активности Na, К-зависимой (А) и Mg-зависимой (Б) АТФ-аз в мозговой ткани крыс разного возраста, перенесших интранатальную гипоксию.

Достоверные различия ($P < 0,01$) обозначены стрелкой.

ных ферментов [2]. Снижалась активность Mg-АТФ-азы ($0,1871 \pm 0,0082$ в контроле, $0,1569 \pm 0,0077$ в опыте; $P < 0,01$). Энергетический заряд системы соответствовал изменениям адениловых нуклеотидов и к 4—5-му месяцу становился достоверно ниже, чем в контроле ($0,94 \pm 0,0081$ в контроле, $0,89 \pm 0,0088$ в опыте; $P < 0,01$).

Таким образом, в течение 1-й недели жизни после внутриутробной асфиксии состояние аденилатной системы свидетельствует о сохранении в ткани больших полушарий головного мозга состояния хронической гипоксии. Уже к концу этого периода наступает постгипоксическая активизация энергетического обмена, которая длится в течение 1-го месяца жизни и совпадает с периодом относительного восстановления нервной ткани. Есть основания полагать, что по крайней мере первоначально в критический период роста и дифференцировки нейронов (7—10-й день жизни) повышение уровня энергетических резервов свидетельствует о сниженной способности ткани мозга использовать доступную энергию. На это косвенно может указывать сниженная активность АТФ-аз, характер изменения содержания свободных аминокислот в ткани мозга. После кратковременного восстановительного периода вновь начинают преобладать дистрофические и дегенеративные

процессы, начинает сдавать и энергетическая система. Этому соответствует также ранее выявленный факт снижения активности окислительно-восстановительных ферментов. Ход выявленных изменений биохимических пока-

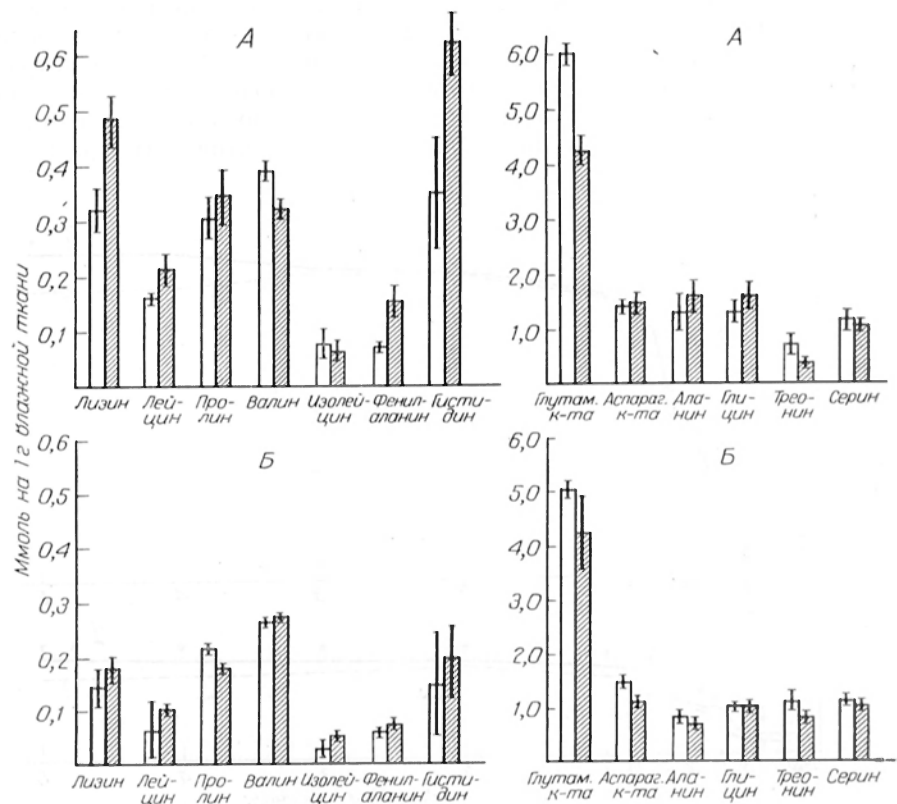


Рис. 6. Изменение содержания свободных аминокислот в мозговой ткани новорожденных (А) и 6-дневных (Б) крыс, перенесших интранатальную гипоксию.

Представлены средние арифметические величины и ошибки средней арифметической (вертикальные линии). Звездочка — статистически значимые различия ($P < 0,01$). Светлые столбики — контроль; темные — гипоксия.

зателей и морфологических картин в мозге поврежденных внутриутробно животных по своей тенденции имеет сходство с процессами преждевременного старения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жукова Т. П., Пурич В. Р. — Вopr. oхp. мат., 1972, № 8, с. 19—23.
2. Zhukova T. P. — Wissenschaftl. Z. Univ. Rostock, 1976, Bd 25, S. 51—58.
3. Паленова Н. Г. — Бюлл. эксперим. биол., 1977, № 3, с. 361—364.
4. Lowry O. H., Passonneau J. V., Hasselberger F. X. et al. — J. biol. Chem., 1964, v. 239, p. 18—30.
5. Lowry O. H., Passonneau J. V. — Ibid., 1964, v. 239, p. 31—42.
6. Duffy T. E., Nelson S. R., Lowry O. H. — J. Neurochem., 1972, v. 19, p. 959—977.
7. Mac Millan V., Siesjo B. K. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1972, v. 30, p. 127—136.
8. Коростовцева Н. В. Повышение устойчивости к гипоксии. Л., 1976.
9. Adlard B. P. F., De Souza S. W. — Biol. Neonat., 1974, v. 24, p. 82—88.
10. Barlet H. H. — J. Neurochem., 1976, v. 26, p. 1267—1274.
11. Stastny F., Sedlacek J. — Brain Res., 1973, v. 53, p. 243—246.
12. Thurston J. H., Mac Dougl D. B. — Am. J. Physiol., 1969, v. 216, p. 348—352.

13. *Stastny F., Autosova E., Kostir J. et al.* — Brain Res., 1971, v. 33, p. 597—600.
14. *Жукова Т. П., Пурин В. Р.* — Бюлл. exper. биол., 1967, № 7, с. 123—125.
15. *Adam H.* — In: Methodes der enzymatischen Analyse. Ed. H. U. Bergmeyer. Weinheim, 1965, S. 573—578.
16. *Hohorst H. J.* — In: Methodes der enzymatischen Analyse. Ed. H. U. Bergmeyer. Weinheim, 1962, S. 622—624.
17. *Sin Io, Russel I., Taylor A. W.* — J. appl. Physiol., 1970, v. 28, p. 234—236.
18. *Jorgensen P. L., Skou J. C.* — Biochim. biophys. Acta, 1971, v. 233, p. 366—380.
19. *Глебов Р. Н., Гуринович А. Х., Осташева Г. А. и др.* — Биохимия, 1970, № 6, с. 1084—1089.
20. *Lowry O. H., Lopez J. A.* — J. biol. Chem., 1946, v. 162, p. 421—428.
21. *Atkinson D. E.* — Biochemistry (Wash.), 1968, v. 7, p. 4030—4034.

Поступила 26/I 1979 г.

POSTHYPOXIC ALTERATIONS IN METABOLISM OF DEVELOPING BRAIN

T. P. Zzukova, E. G. Sorokina, Yu. G. Popandopulo

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

Effect of intranatal hypoxia on content of adenylic nucleotides, glycogen, lactic acid as well as on activity of ATP-ases and concentration of free amino acids was studied in rat brain tissue at various periods of postnatal development (1 day-5 months). Acute hypoxia was accompanied by a decrease in content of adenylic nucleotides and glycogen, by an increase in concentration of lactic acid and by a decrease in activity of ATP-ases. During the subsequent periods, in brain tissue of animals, subjected to hypoxia, posthypoxic activation of energy metabolism was found, which depended apparently on the decreased intensity of plastic processes during the phase of active growth and of neurone differentiation. Content of the essential amino acids, actively participating in protein synthesis, was increased but concentration of nonessential amino acids was decreased at this step. The subsequent decrease in content of macroergic compounds, increase in concentration of lactic acid and inorganic phosphate as well as the decrease in activity of ATP-ases were observed in 1.5-2 months old experimental animals. The biochemical and morphological data suggest that intranatal hypoxia is responsible for irreversible impairments in developing brain.

УДК 616.43-092.9-008.931:577.152.121

Н. Р. Аблаев, Г. И. Петрова, Д. К. Солтыбаева

АКТИВНОСТЬ α -ГЛИЦЕРОФOSFATДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ КРОЛИКОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЭНДОКРИННЫХ НАРУШЕНИЯХ

Кафедра биохимии Алма-Атинского медицинского института

Известно, что α -глицерофосфатдегидрогеназа (α -ГФДГ) существует в двух формах: входящая в состав цитоплазмы α -ГФДГ является НАД-зависимой, митохондриальная α -ГФДГ относится к флавопротеидам [1]. С участием этих двух форм α -ГФДГ функционирует α -глицерофосфатный цикл, связывающий два важнейших энергетических процесса — гликолиз и тканевое дыхание. Считают, что на данный цикл воздействуют тиреоидные гормоны, которые могут стимулировать в митохондриях синтез как апофермента [2, 3]— α -ГФДГ, так и кофермента — ФАД [4]. Вместе с тем имеются сообщения о том, что не во всех тканях и не у всех видов животных α -ГФДГ одинаково чувствительна к тиреоидным гормонам [5].

Влияние других гормонов на данный фермент изучено недостаточно.

Методика

Исследования проведены на 70 половозрелых кроликах-самцах массой 2—2,5 кг, содержащихся в условиях обычного рациона вивария. Животных декапитировали после 18-часового голодания.

Гипотиреоз у кроликов вызывали путем добавления к пище метилтиоурацила по 1 г/кг в течение 30—35 дней, а гипертиреоз — путем скармливания животным

Таблица 1
Активность α -ГФДГ (в мг диформазана на 1 г белка за 30 мин при 37 °C) в органах и тканях кроликов при избытке и недостатке тиреоидных гормонов и инсулина

Орган (ткань)	Статистический показатель	Контроль		Гипотиреоз		Гипертиреоз		Аллоксановый диабет		Введение инсулина (кома)	
		О	Мх	О	Мх	О	Мх	О	Мх	О	Мх
Печень	$M \pm m$ % от нормы	24,2 ± 2,61	1,68 ± 0,17	11,5 ± 1,31 <0,01 49	1,0 ± 0,12 <0,05 60	25,5 ± 3,91 >0,5 106	5,2 ± 0,72 <0,001 306	22,7 ± 3,16 >0,5 95	1,61 ± 0,21 <0,5 97	3,26 ± 0,29 <0,001 13	1,65 ± 0,17 >0,5 97
Почка	$M \pm m$ % от нормы	51,8 ± 6,23	2,88 ± 0,32	14,6 ± 1,56 <0,001 28	1,10 ± 0,10 <0,001 40	49,7 ± 6,71 <0,5 96	5,80 ± 0,71 <0,01 200	27,7 ± 3,42 <0,001 53	2,20 ± 0,30 <0,05 70	3,46 ± 0,33 <0,001 6	1,63 ± 0,13 <0,001 55
Сердце	$M \pm m$ % от нормы	66,0 ± 7,14	8,10 ± 1,12	21,3 ± 3,18 <0,001 29	3,70 ± 0,39 <0,01 46	76,3 ± 9,13 <0,2 115	10,9 ± 1,30 <0,05 136	6,21 ± 0,64 <0,001 9	4,63 ± 0,44 <0,001 58	8,36 ± 0,91 <0,001 12	4,73 ± 0,52 <0,001 60
Мышцы бедра	$M \pm m$ % от нормы	6,42 ± 0,77	3,21 ± 0,43	6,70 ± 0,72 <0,5 104	1,10 ± 0,12 <0,001 34	15,6 ± 2,17 <0,001 244	6,50 ± 0,80 <0,001 203	10,9 ± 1,31 <0,05 170	4,73 ± 0,57 <0,02 147	6,22 ± 0,73 >0,5 97	3,36 ± 0,29 <0,5 101

Примечание. О — общая активность α -ГФДГ; Мх — активность митохондриальной α -ГФДГ.

тиреоидина по 0,3 г/кг в течение 4—5 нед до потери животным $\frac{1}{3}$ исходной массы. В опыт брали животных на высоте развития соответствующего состояния, о чем судили по уровню белковосвязанного йода (БСИ) в плазме крови, который определяли спектрофотометрически [6]. Части животных внутривенно вводили 10% раствор аллоксана, приготовленный на физиологическом растворе (130—150 мг/кг). Животных забивали через 4 нед после введения аллоксана, когда уровень сахара в крови превышал 300 мг/100 мл. В одной из серий (V) животным внутримышечно вводили инсулин пролонгированного действия в течение 12—14 дней — вначале по 2—4 ЕД/кг, затем дозы постепенно увеличивали до 10—12 ЕД/кг; животных брали в опыт, как правило, при развитии гипогликемической комы.

Активность α -ГФДГ в тканях печени, почек и сердца определяли неотетразоливым методом [7]. При определении активности митохондриальной α -ГФДГ инкубационная смесь состояла из гомогената соответствующей ткани, субстрата, неотетразолия хлорида и фосфатного буфера; для исследования общей активности α -ГФДГ (цитоплазматической и митохондриальной) в указанную смесь добавляли также НАД. Активность обеих форм α -ГФДГ выражали в миллиграммах образующегося диформазана на 1 г тканевого белка за 30 мин при 37°C. Содержание белка в тканях определяли биуретовым методом [8].

Кроме отмеченных показателей, с помощью флюориметрического метода в крови кроликов определяли концентрацию 11-оксикортикостероидов [9] и адrenaлина [10]. Полученные результаты обработаны статистически [11].

Результаты и обсуждение

Как показано в табл. 1, активность α -ГФДГ в различных органах и тканях животных неодинакова. Характер ее изменений при тех или иных гормональных нарушениях подчиняется определенным закономерностям. Активность митохондриальной α -ГФДГ значительно ниже активности цитоплазматической формы фермента. При гипотиреозе активность обеих форм α -ГФДГ резко (почти в 2 раза и более) снижается. При гипертиреозе, наоборот, скорость окисления α -глицерофосфата в такой же степени возрастает, особенно в митохондриях. Анализ приведенных данных наталкивает на

мысль, что тиреоидные гормоны стимулируют активность α -ГФДГ. Более того, речь может идти об индуцировании этими гормонами синтеза новых ферментных молекул, как на это указывают и некоторые авторы [12, 13]. Однако возможность прямого воздействия этих гормонов на активность α -ГФДГ вызывает некоторое сомнение, если обратить внимание на данные, полученные в следующих сериях опытов.

Аллоксановый диабет и гипогликемическая кома, вызванная введением инсулина, по своим основным характеристикам являются диаметрально противоположными состояниями. В то же время активность исследованного фермента в обоих случаях претерпевает почти одинаковые изменения: интенсивность окисления α -глицерофосфата снижается в 2 раза и более в тканях почек и сердца как при недостатке, так и при избытке инсулина (см. табл. 1). В печени и мышцах бедра активность α -ГФДГ, особенно ФАД-зависимой формы, изменяется не столь значительно. Можно было бы полагать, что инсулин не оказывает прямого влияния на функционирование α -глицерофосфатного цикла, а наблюдаемые изменения обусловлены действием других факторов (и гормонов).

По некоторым данным литературы [14, 15], при гипогликемической коме под влиянием больших доз инсулина резко повышается функциональная активность системы гипоталамус — гипофиз — щитовидная железа и многократно возрастает содержание тиреоидных гормонов в крови и тканях. Согласно результатам наших собственных исследований, уровень БСИ в плазме крови при диабете и гиперинсулинизме также повышается соответственно до 228 и 308% от контроля. Следовательно, если бы тиреоидные гормоны служили единственным регулятором указанного цикла, то при обоих типах инсулярной патологии следовало бы ожидать существенного повышения активности α -ГФДГ. Но картина, как видим, иная. И такая ситуация характерна не только для α -ГФДГ, но и для ряда других биохимических показателей [16, 17].

Таблица 2

Содержание белковосвязанного йода, 11-оксикортикостероидов и адреналина в крови кроликов при гормональных нарушениях

Исследуемый показатель	Контроль	Гипотиреоз	Гипертиреоз	Аллоксановый диабет	Введение инсулина (кома)
Белковосвязанный йод, мкг/100 мл <i>P</i>	4,6 \pm 0,33	2,6 \pm 0,41 <0,01	10,6 \pm 0,93 <0,001	10,5 \pm 0,51 <0,001	14,2 \pm 0,53 <0,001
11-Оксикортикостероиды, мкг/100 мл <i>P</i>	6,4 \pm 0,62	7,2 \pm 0,63 <0,05	7,2 \pm 0,48 <0,05	10,6 \pm 1,31 <0,01	11,3 \pm 1,41 <0,01
Адреналин, мкг/л <i>P</i>	0,90 \pm 0,07	0,77 \pm 0,03 <0,02	1,05 \pm 0,06 <0,02	1,27 \pm 0,09 <0,01	0,22 \pm 0,09 <0,001

Избыток и недостаток тиреоидных гормонов и инсулина сопровождаются также выраженными изменениями функций надпочечников (табл. 2). При гипертиреозе стимулируется секреция гормона роста [18], усиливаются секреция [19] и метаболизм стероидных гормонов [20].

Не останавливаясь на возможных механизмах функциональной взаимосвязи между отдельными эндокринными органами и не отрицая индуцирования синтеза α -ГФДГ и других оксидоредуктаз тиреоидными гормонами, мы вместе с тем склонны считать, что в условиях *in vivo* даже при преимущественном, специфическом воздействии того или иного гормона на содержание и активность определенного фермента реализация такого гормонального эффекта может существенным образом изменяться под влиянием сопут-

ствующих физиологических и патологических факторов в данных конкретных условиях. Эти факторы прямо или косвенно могут участвовать в сложных процессах синтеза и секреции гормона-индуктора, его метаболизма в тканях, изменять сродство гормона к соответствующим рецепторам.

Открытие гипоталамических гормональных веществ, циклических нуклеотидов [21—23], соматостатина, соматомединов [24] и выявление их эндокринных функций в периферических органах заставляют по-новому оценить сведения о регуляции метаболизма в тканях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер А. Митохондрия. М., 1966.
2. Tarentino A. L., Richert D. A., Westerfeld W. W. — Biochim. biophys. Acta, 1966, v. 124, p. 295—309.
3. Lee K. L., Miller O. N. — Molec. Pharmacol., 1967, v. 3, p. 44—51.
4. Wolf L., Rivlin R. S. — Endocrinology, 1970, v. 86, p. 1347—1353.
5. Lee Y.-P., Liu C.-Y., Hsu H. T. — Ibid., p. 241—250.
6. Степанов Г. С. — Лабор. дело, 1965, № 10, с. 594—599.
7. Oda T., Okazaki H. — Acta med. Okayama, 1958, v. 2, p. 193—204.
8. Lowry O. H. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
9. Панков Ю. А., Усватова И. Я. — В кн.: Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов. М., 1965, с. 137—145.
10. Матлина Э. III. — Там же, с. 84—88.
11. Асатиани В. С. — Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965, с. 495—510.
12. Lee Y.-P., Lardy H. A. — J. biol. Chem., 1965, v. 240, p. 1427—1436.
13. Lee Y.-P., Takemori A. E., Lardy H. A. — Ibid., 1959, v. 234, p. 3051—3054.
14. Blum C., Brisson-Longarre A., De Nayer P. — Diabete et Metabol., 1977, v. 3, p. 235—238.
15. Leung Y., Luansing A. R. et al. — Endocrinology, 1975, v. 97, p. 380—384.
16. Солтыбаева Д. К. Активность ряда дегидрогеназ в органах и тканях кроликов при экспериментальных нарушениях функций щитовидной, поджелудочной и надпочечных желез. Дис. канд. Алма-Ата, 1974.
17. Разумкова В. Ф. Инсулиновая активность и ее взаимосвязь с углеводными и липидным обменами у кроликов и собак в условиях дефицита и избытка гормонов щитовидной, поджелудочной и надпочечных желез. Дис. канд. Алма-Ата, 1976.
18. Peake L. T., Birge C. A., Daughaday W. H. — Endocrinology, 1973, v. 92, p. 487—493.
19. Гагелганс А. И., Гайдина Г. А. и др. — В кн.: Тиреоидные гормоны, Ташкент, 1972, с. 203—214.
20. Soutaren A. L. — Bull. N. Y. Acad. Med., 1977, v. 53, p. 241—259.
21. Bernal Y., Refetoff S. — Clin. Endocr., 1977, v. 6, p. 227—249.
22. Туракулов Я. Х., Халиков С. К., Далимова С. — В кн.: Циклические нуклеотиды. Красноярск, 1976, с. 101—102.
23. Далимова С., Байзакова Н. — Там же, с. 103—104.
24. Kerstin H., Tanako K. et al. — Advanc. Metabol. Dis., 1975, v. 8, p. 19—46.

Поступила 26/I 1979 г.

ACTIVITY OF α -GLYCEROPHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM RABBIT TISSUES IN VARIOUS ENDOCRINE DISFUNCTIONS

N. R. Ablaev, G. I. Petrova, D. K. Soltybaeva

Chair of Biochemistry, State Medical School, Alma-Ata

Activity of α -glycerophosphate dehydrogenase (GPDG) from rabbit tissues was distinctly decreased in hypothyroidism and increased in hyperthyroidism. In alloxane diabetes and after administration of high doses of insulin the GPDG activity, and especially the activity of its mitochondrial form, was markedly decreased in kidney and heart tissues; it was unaltered or slightly increased in liver tissue and skeletal muscles, as compared with control. The hormonal regulation of the GPDG activity is a complicated process, in which are involved not only the hormones of thyroid gland but also hormones of other endocrine glands.

Н. И. Бродская, Л. И. Янсен, Г. В. Кудрявцева

АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ТРАНСКЕТОЛАЗЫ В КРОВИ НЕЙРООНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ДО ОПЕРАЦИИ И В ДИНАМИКЕ ПОСТОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА

Ленинградский университет

У нейроонкологических больных, как известно, внутричерепная гипертензия сопровождается замедлением скорости мозгового кровотока и снижением интенсивности потребления кислорода тканью головного мозга, что приводит к развитию гипоксического состояния органа [1].

В ряде работ установлено, что при церебральных опухолевых процессах различного этиопатогенеза наблюдаются существенные расстройства метаболических функций: снижение уровня секреции тропных гормонов, кортикостероидов [2], глубокое угнетение многих окислительно-восстановительных реакций [3] и реакций углеводного обмена [1, 4], выход в кровяное русло фенола и его усиленная экскреция с мочой [5]. Однако биохимические изменения, наступающие в организме под влиянием симптомокомплекса нарушений структуры и функции нейрональных образований, исследованы незначительно. Для неврологической и нейрохирургической клиники необходимо дальнейшее изучение состояния обмена веществ больного до и после оперативного вмешательства по поводу опухолевого заболевания головного мозга. Кроме того, определенную диагностическую ценность представляет разработка надежных специфических ферментативных тестов, позволяющих констатировать не только наличие опухолей головного мозга, но и четко регистрировать фазы развития ответной системной реакции организма на хирургическое вмешательство.

В связи с изложенным, в настоящей работе исследована активность ключевых ферментов окислительной и неокислительной ветвей пентозо-фосфатного пути метаболизма углеводов (ПФП) — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД, КФ.1.1.1.19) и транскетолазы (ТК, КФ.2.2.1.1) в крови больных с доброкачественными новообразованиями головного мозга различной гистоструктуры и локализации (аденома гипофиза, менингиома). Дополнительную задачу работы составило изучение активности названных ферментов ПФП после оперативного вмешательства по поводу удаления опухоли мозга и в динамике постоперационного периода. Работа выполнена на базе клиники Ленинградского научно-исследовательского нейрохирургического института им. А. Л. Поленова.

М е т о д и к а

Исследовали активность Г-6-ФД эритроцитов и ТК цельной крови описанными ранее методами [6, 7] у практически здоровых людей (контрольная группа) и больных с аденомой гипофиза и менингиомой. Активность ферментов определяли также в послеоперационном периоде на 1, 5—7 и 10—15-е сутки, что соответствует, по данным нейрохирургической клиники, наиболее тяжелому состоянию больного — периоду перелома постоперационного течения заболевания, состоянию выздоровления [8]. Активность Г-6-ФД и ТК выражали соответственно в единицах активности фермента¹ в 1 мин при 26°C в расчете на 10⁹ эритроцитов в микромолях седогептулозо-7-фосфата, образовавшегося за 1 ч при 37°C в 1 мл цельной крови. Было обследовано 11 больных с аденомой гипофиза и 8 с менингиомой головного мозга (в возрасте от 26 до 45 лет); контрольную группу составили 10 практически здоровых лиц в возрасте от 26 до 35 лет. Локализация и гистоструктура опухолей были определены с

¹ За единицу активности Г-6-ФД принимали количество фермента, которое изменяло оптическую плотность инкубационной пробы при 340 нм и конечном объеме реакционной смеси 3 мл на 0,001 за 1 мин при 26°C.

помощью рентгеноконтрастных и гистологических методов, а также непосредственно при операции. Результаты обработаны статистически. Был принят 95% уровень достоверности.

Результаты и обсуждение

Дегидрогеназы ПФП изучены довольно подробно в метаболизме опухолей головного мозга. По наблюдениям многих авторов, активность Г-6-ФД и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГД) в опухолевых тканях мозга (независимо от их гистологического типа) была в 3—10 раз выше, чем в норме [9—11]. Однако исследователи пришли к заключению, что такие изменения активности дегидрогеназ ПФП все же нельзя считать специфическим признаком атипического перерождения нейрональных структур, отличающихся чрезвычайно высокой гетерогенностью, поскольку активность этих ферментов сильно варьирует в различных клеточных популяциях мозга [9].

Таблица 1

Активность Г-6-ФД эритроцитов (в ед. на 10^9 эритроцитов) и ТК цельной крови (в мкмоль седогентулозо-7-фосфата на 1 мл в 1 ч) практически здоровых людей и нейроонкологических больных (аденома гипофиза, менингиома) до операции и в динамике постоперационного периода

Условия эксперимента	Г-6-ФД	P^*	P^{**}	ТК	P^*	P^{**}
Контроль ($n=10$)	$259 \pm 5,47$	—	—	$9,85 \pm 0,40$	—	—
Аденома гипофиза ($n=10$):						
до операции	$233 \pm 10,8$	$<0,05$		$10,26 \pm 0,39$	—	
после операции:						
1-е сутки	$330 \pm 8,1$		$<0,001$	$16,25 \pm 0,49$		$<0,001$
5—7-е сутки	$305 \pm 4,3$		$<0,001$	$13,93 \pm 0,29$		—
10—15-е »	$340 \pm 10,9$		$<0,001$	$14,76 \pm 0,53$		$<0,001$
Менингиома ($n=8$):						
до операции	$279 \pm 4,9$	$<0,02$		$13,40 \pm 0,45$	$<0,001$	
после операции:						
1-е сутки	$357 \pm 12,0$		$<0,001$	$18,33 \pm 0,42$		$<0,001$
5—7-е сутки	$365 \pm 8,6$		$<0,001$	$16,35 \pm 0,51$		—
10—15-е »	$378 \pm 7,4$		$<0,001$	$14,08 \pm 0,54$		—

Примечание. P^* — достоверность различий по сравнению с контрольной группой (до операции); P^{**} — достоверность различий по сравнению с исходными величинами (до операции) внутри каждой группы. n — число опытов.

Как показали результаты исследований, наличие опухолей головного мозга не вызывает существенных изменений активности дегидрогеназ ПФП в крови больных. В табл. 1 приведены результаты определения активности Г-6-ФД и ТК в эритроцитах и цельной крови нейроонкологических больных с аденомами гипофиза и менингиомами до операции и в динамике постоперационного периода.

В группе больных с аденомами гипофиза (опухоли железистого характера) наблюдается некоторое снижение ($P<0,05$) активности Г-6-ФД эритроцитов по сравнению с данными контрольной группы, а активность ТК цельной крови практически не изменяется.

В крови больных с менингиомами головного мозга (опухоли сосудистого ряда) установлено незначительное повышение активности Г-6-ФД и ТК относительно контроля, что достоверно превышает активность этих ферментов у больных с аденомами гипофиза ($P<0,01$ и $P<0,001$ соответственно). По данным литературы, у больных с менингиомами головного мозга гормональная недостаточность выражена в меньшей степени (вследствие некоторого удаления опухоли от гипоталамо-гипофизарной области), чем у

больных с опухолями гипофиза. Кроме того, менингиома головного мозга представляет собой медленно растущее новообразование, которое способствует формированию адаптивных реакций организма на развивающуюся патологию [9]. Однако отмеченные изменения активности ферментов ПФП в крови больных с рассмотренными патологическими состояниями весьма незначительны.

Характерным для постоперационного периода является повышение в крови больных уровня многих гормонов (катехоламинов, АКТГ, кортико-стероидов, инсулина, глюкагона, тироксина и др.) за счет симпатико-адренергической и эндокринной ответной реакции, связанной главным образом с гиперфункцией системы: гипоталамус — гипофиз — надпочечники [12].

В 1-е сутки после операции в группе больных с аденомой гипофиза и менингиомой головного мозга активность Г-6-ФД эритроцитов и ТК крови значительно возрастает (см. табл. 1). Это обусловлено, вероятно, неспецифической компенсаторно-приспособительной реакцией организма в ответ на оперативное вмеша-

тельство и развитием стрессорного состояния, вызванного функциональной перегрузкой жизненно важных органов, а также усилением биоритмики обменных процессов, обеспечивающих регенерационные преобразования и нормализацию смещенных биологических констант организма [9, 13].

Активность Г-6-ФД и ТК после удаления аденомы гипофиза возрастает на 42 и 58% соответственно по сравнению с активностью этих ферментов до операции, а после удаления менингиомы активность Г-6-ФД и ТК увеличивается на 28 и 37% соответственно.

На 5—7-е сутки после удаления аденомы гипофиза или менингиомы активность Г-6-ФД и ТК остается значительно выше дооперационного уровня (см. табл. 1). Течение послеоперационного периода у 1 пациента с аденомой гипофиза было осложнено состоянием длительно продолжавшегося шока. Известно, что шок характеризуется состоянием глубокой гипоксии, значительной гипергликемией, ацидозом, нарушением окислительно-восстановительных процессов и резким снижением содержания НАД⁺ и НАДФ⁺ [14]. Изменение активности Г-6-ФД эритроцитов и ТК цельной крови у этого больного представлено в табл. 2. Как видно из табл. 2, активность Г-6-ФД эритроцитов почти не изменяется в 1-е сутки после операции по отношению к дооперационному уровню активности фермента и резко возрастает на 7-е сутки непосредственно перед летальным исходом, превышая, таким образом, величину активности фермента при всех рассмотренных нами состояниях. Такой подъем активности Г-6-ФД, очевидно, характеризует необратимую стадию шока. Активность ТК у этого больного уже в 1-е сутки после хирургического вмешательства возросла в 2 раза и достигла максимума на 7-й день после операции, превысив активность ТК больных с благоприятным течением постоперационного периода (см. табл. 1 и 2). По-видимому, резкое возрастание активности ТК является сигналом развития необратимых деструктивных изменений в организме.

На 10—15-е сутки постоперационного периода активность Г-6-ФД эритроцитов у больных обеих групп (особенно группы с удаленными аденомами гипофиза) оставалась высокой. Это, несомненно, связано с моби-

Таблица 2

Активность Г-6-ФД эритроцитов и ТК цельной крови у больного аденомой гипофиза, с летальным исходом на 7-е сутки после операции

Активность фермента	До операции	После операции	
		1-е сутки	7-е сутки
Г-6-ФД, ед. на 10 ⁹ эритроцитов в 1 мин	286	300	470
ТК, мкмоль седогептало-7-фосфата на 1 мл крови в 1 ч	9,0	18,0	19,1

лизацией анаболических процессов в организме, направленных на восстановление синтетических и энергетических ресурсов, израсходованных в период операции и ранний постоперационный период (см. табл. 1). Активность ТК цельной крови на 10—15-е сутки операции имеет тенденцию к снижению, но остается еще значительно выше уровня контроля (на 50 и 43% соответственно у групп больных с удаленными аденомами гипофиза и менингиомами).

Можно заключить, что наличие доброкачественных опухолей головного мозга различной гистоструктуры и локализации оказывает неспецифическое влияние на ферменты ПФП в крови больных. При аденоме гипофиза, затрагивающей непосредственно гипоталамо-гипофизарную область головного мозга, активность Г-6-ФД эритроцитов практически не отличается от контрольного уровня. У пациентов после оперативного удаления аденомы гипофиза отмечается высокая активность Г-6-ФД эритроцитов, сохраняющаяся в течение всего постоперационного периода. В случае менингиомы головного мозга, оказывающей опосредованные воздействия на стволовые образования, активность ферментов ПФП мало отличается от контрольного уровня и имеет высокие величины активности (по сравнению с дооперационным уровнем) на протяжении всей постоперационной фазы. Изменения активности ТК цельной крови в динамике постоперационного периода также почти не различаются у обеих групп больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бродская Н. И., Никуленко Е. Л., Олюшин В. Е. — *Вопр. нейрохир.*, 1974, № 3 с. 3.
2. Арутюнов А. И. — В кн.: *Опухоли головного мозга*. М., 1975, с. 114.
3. Говорова Л. В. Влияние различных форм гипоксии на некоторые ферменты энергетического обмена и активного транспорта ионов. Автореф. дис. канд. Л., 1977.
4. Промыслова М. III. — В кн.: *Всесоюзный биохимический съезд. 3-й. Тезисы симпозиальных докладов*. Рига, 1974, т. 2, с. 226.
5. Зозуля Ю. А., Качала Г. М. — В кн.: *Опухоли гипофиза и криофарингеомы*. М., 1963, с. 281.
6. Kornberg A., Horecker B. L. — *Meth. Enzymol.*, 1955, v. 1, p. 323.
7. Brownstone I., Denstedt O. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1961, v. 39, p. 533.
8. Арутюнов А. И. — В кн.: *Опухоли гипофиза и краниофарингеомы*. М., 1963, с. 65.
9. Wollemann M. *Biochemistry of Brain Tumours*. Budapest, 1974.
10. Zwetnow N. N. — *Acta physiol. scand.*, 1970, v. 69, p. 158.
11. Perria L., Viale G., Ibba F. et al. — *Neuropsychiatria*, 1964, v. 20, p. 3.
12. Lehrer G. M. — In: *The Biology and Treatment of Intractable Tumors*. Ed. W. S. Fields et al. Springfield, 1962, p. 14.
13. Покровский А. А., Коровников К. А. — В кн.: *Пентозофосфатный путь, его механизмы и регуляция*. Л., 1977, с. 37.
14. Теодореску-Экзарку И. *Общая хирургическая агрессология*. Бухарест, 1972.

Поступила 26/I 1979 г.

ACTIVITIES OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE AND TRANSKETOLASE IN BLOOD OF NEUROONCOLOGICAL PATIENTS BEFORE SURGICAL TREATMENT AND IN DYNAMICS OF POSTOPERATIONAL PERIOD

N. I. Brodskaya, L. I. Yansken, G. V. Kudryavtseva

State Univesity, Leningrad

Brain benign tumors /hypophyseal adenoma, meningecma/ caused definite effects on the enzymes of pentosephosphate pathway in blood of patients. Distinct decrease in glucose-6-phosphate dehydrogenase /G6PD/ activity was observed in erythrocytes of patients with adenoma of hypophysis as compared with a control group; transketolase /TK/ activity was unaltered. In blood of patients with brain meningecmas the G6PD was activated by 8% and TK — by 36%. Within the first day after resection of the tumors activity of the enzymes was distinctly increased; it remained markedly higher than the enzymatic activity before the operation within all the periods studied /5-7 days and 10-15 days after the operation/.

Г. Г. Иванов

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЭНТЕРОЛИЗОВАННЫХ УЧАСТКАХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ ЖЕЛЧИ

Лаборатория хирургической гастроэнтерологии Центральной научно-исследовательской лаборатории Свердловского медицинского института на базе Курганской областной больницы

Выявленная нами различная направленность некоторых видов обмена в слизистой оболочке желудка человека при язвенной болезни в зависимости от локализации язвы и удаленности от привратника [1, 2] возможно связана с различным нарушением морфологической структуры слизистой оболочки, в частности с появлением вместо обычного желудочного эпителия очагов кишечного эпителия, так называемой энтеролизацией [3—6]. В ряде этих сообщений убедительно показано более частое развитие очагов энтеролизации при локализации язвы в желудке. Установлено, что энтеролизованные клетки идентичны кишечному эпителию не только морфологически, но и функционально. Так, выделяемая в участках энтеролизации слизь имеет примерно тот же состав, что и вырабатываемая кишечным эпителием [7, 8], идентичность установлена также в отношении дисахаридазной активности [9]. Гистохимическими исследованиями установлено изменение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [10], щелочной фосфатазы (ЩФ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) [11—13] в метаплазированной слизистой оболочке по сравнению с нормальными участками. Все это побудило нас изучить состояние углеводного обмена путем исследования активности ЛДГ, Г-6-ФДГ и содержания молочной кислоты, а также процессов переаминирования и активности ЩФ в нормальной слизистой оболочке и в участках энтеролизации. Кроме того, было изучено влияние желчи *in vitro* на активность ЛДГ, Г-6-ФДГ и ЩФ, так как, по некоторым данным [14], явление энтеролизации связано с длительным забросом содержимого двенадцатиперстной кишки (ДПК) в желудок.

Методика

Для исследования вырезали отдельные участки слизистой оболочки желудка, полученного у больных после резекции по поводу язвенной болезни. Иссекали участки по малой кривизне на различном расстоянии от привратника и участок по большой кривизне. Выше и ниже вырезаемого участка иссекали полоску ткани для гистологического изучения с целью выявления энтеролизации. Эта часть работы выполнена старшим научным сотрудником М. Е. Матвеевко [14]. Приготовление гомогенатов тканей подробно описано в наших прежних работах. Активность ЛДГ, Г-6-ФДГ и концентрацию молочной кислоты определяли с помощью оптического теста Варбурга с применением наборов реактивов фирмы «Берлингер».

Активность трансаминаз аспартат-аминотрансферазы (АСТ) и аланин-аминотрансферазы (АЛТ) определяли унифицированным методом с готовым набором реактивов по Райту, а активность ЩФ с *p*-нитрофенилфосфатом натрия в качестве субстрата с применением наборов фирмы «Биолахема». Активность ферментов рассчитывали в микромолях соответствующих субстратов на 1 мг белка в 1 мин, концентрацию молочной кислоты — в миллиграмм-процентах. С целью изучения влияния желчи к гомогенату ткани в количестве 1,2 мл добавляли дуоденальное содержимое или раствор гликохолевой кислоты в конечной концентрации 1,0 мг/мл и инкубировали при 37°C в среде следующего состава: 1,5 мл 0,08 М глицинового буфера pH 7,5, 1 мл H₂O, 0,2 мл 0,1 М MgCl₂, 0,2 мл 1,5·10⁻³ НАД, 0,2 мл 0,1 М глюкозо-6-фосфата и 0,1 мл гомогената. Данная среда применялась для определения активности Г-6-ФДГ; для определения активности ЛДГ и ЩФ использовали соответствующие субстраты, при изучении активности ЛДГ вместо НАД употребляли НАД·Н. Среда для изучения скорости превращения рибозо-5-фосфата имела следующий состав: 1,5 мл глицил-глицинового буфера pH 7,6, 3,3 мл H₂O, 1,5 мл 0,1 М MgCl₂, 0,6 мл 0,02 М рибозо-5-фосфата и 0,6 мл гомогената. Концентрацию рибозы определяли по реакции с орцином.

Активность ЛДГ, Г-6-ФДГ, трансаминаз, ЩФ (в мкмоль соответствующих субстратов на 1 мг белка в 1 мин) и концентрация молочной кислоты (в мг%) в нормальной и энтеролизованной слизистой оболочке желудка ($n=10$)

Показатель	ЛДГ	Г-6-ФДГ	Лактат	АСТ	АЛТ	ЩФ
Нормальная слизистая оболочка (контроль)						
$M \pm m$	25.1 ± 1.1	5.3 ± 0.85	15.9 ± 1.0	0.68 ± 0.1	0.07 ± 0.006	0.56 ± 0.05
Границы колебаний	18.5—33.1	2.3—10.1	10.3—19.7	$0.62-0.8$	$0.03-0.09$	$0.33-0.84$
Энтеролизованные участки						
$M \pm m$	20.6 ± 1.04	13.6 ± 1.45	5.1 ± 1.37	0.72 ± 0.12	0.15 ± 0.09	0.9 ± 0.078
Границы колебаний	13.2—26.9	5.6—18.50	$1.0-13.8$	$0.60-0.8$	$0.07-0.25$	$0.28-1.24$
P по отношению к контролю	<0.05	<0.001	<0.001	>0.05	<0.001	<0.001

Результаты и обсуждение

Полученные нами данные показали, что обмен углеводов протекает различно в энтеролизованных участках слизистой оболочки желудка и в слизистой оболочке, сохранившей собственную структуру. Это прежде всего проявляется в угнетении гликолиза в участках энтеролизации, о чем свидетельствуют низкая активность ЛДГ и резкое снижение концентрации молочной кислоты. Одновременно в энтеролизованной слизистой оболочке желудка увеличивается активность Г-6-ФДГ, что свидетельствует о преобладании пентозофосфатного пути обмена углеводов. Так, активность указанного фермента в очагах энтеролизации в $2\frac{1}{2}$ раза выше, а активность ЛДГ на 20% ниже в энтеролизованных участках слизистой оболочки по сравнению с таковой в нормальной слизистой оболочке.

Изучение активности трансаминаз показало одинаковую активность АСТ и резкое угнетение активности АЛТ в энтеролизованной слизистой оболочке.

Активность ЩФ, как видно из таблицы, значительно увеличена в участках слизистой оболочки, подвергшейся кишечной метаплазии, и составляет 58% по отношению к активности в нормальной слизистой оболочке. Это объясняет полученный нами ранее факт более высокой активности фермента в слизистой оболочке желудка и в желудочном соке при локализации язвенного дефекта в желудке, чем при язвенной болезни ДПК.

Результаты исследования влияния желчи на активность ЛДГ, Г-6-ФДГ и ЩФ представлены на рисунке, из которого видно, что как гликохолевая кислота, так и содержимое ДПК резко снижают активность ферментов углеводного обмена, а также активность ЩФ через 10 мин инкубации. Дальнейшая инкубация гомогената с гликохолевой кислотой вызывает снижение активности ЛДГ и Г-6-ФДГ, которое достигает максимума через 20—30 мин. Содержимое ДПК после 10 мин инкубации приводит к постепенному увеличению активности ферментов, которая достигает исходных величин через 30 мин. Активность Г-6-ФДГ под воздействием содержимого ДПК постепенно снижается, достигая максимума через 20 мин, и вновь незначительно повышается через 30 мин инкубации. Активность ЩФ под воздействием обоих факторов снижается лишь

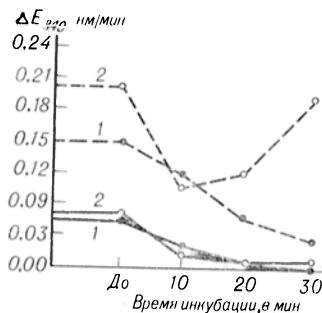
через 10 мин и к 20-й минуте инкубации наблюдается восстановление активности.

Таким образом, содержимое ДПК и гликохолевая кислота угнетают активность изученных нами ферментов и вполне правомочно допустить, что активным началом в содержимом ДПК являются желчные кислоты, а не ферменты панкреатического сока, так как отмечается параллелизм во влиянии этих веществ на активность ферментов, особенно в отношении Г-6-ФДГ.

Полученные нами данные с несомненностью показывают, что некоторые биохимические процессы в очагах энтеролиза протекают совершенно отлично от таковых в слизистой оболочке желудка с сохраненной структурой. Именно этим можно объяснить различную активность ряда непротеолитических ферментов в слизистой оболочке желудка человека при язвенной болезни в зависимости от локализации язвенного дефекта. Чем обширнее будут очаги энтеролиза в слизистой оболочке желудка, тем в большей степени будут нарушены обменные процессы в слизистой оболочке.

В свою очередь изменение обменных процессов в метаплазированной слизистой оболочке желудка может привести к нарушению секреции соляной кислоты и выработке пепсиногена.

На основании полученных данных о влиянии желчи на ферментативную активность *in vitro* можно предположить, что постоянный заброс дуоденального содержимого приводит не только к энтеролизации слизистой оболочки: отдельные ингредиенты содержимого ДПК, в первую очередь желчные кислоты, вызывая угнетение активности ЛДГ и Г-6-ФДГ, приводят к изменению углеводного обмена.



Влияние гликохолевой кислоты (1) и содержимого ДПК (2) (концентрация холевой кислоты 1 мг/мл) *in vitro* на активность ЛДГ (пунктирная линия) и Г-6-ФДГ (сплошная линия) слизистой оболочки желудка человека. Среднее из 6 определений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов Г. Г. — *Вопр. мед. химии*, 1976, № 3, с. 339—342.
2. Иванов Г. Г. — Там же, 1977, № 4, с. 499—503.
3. Лазовский Ю. М. — В кн.: *Многотомное руководство по патологической анатомии*. М., 1956, т. 4, ч. 1, с. 294—457.
4. Королева Н. П. — В кн.: *Вопросы гистотопографии и частной патологии желудка*. Петрозаводск, 1971, с. 26—30.
5. Самсонов В. А. — В кн.: *Актуальные вопросы теории и практики медицины*. Петрозаводск, 1975, с. 119—124.
6. Ploscowe R., Berg G., Segal H. — *Am. J. Dig. Dis.*, 1963, v. 8, p. 311—318.
7. Масевич Ц. Г. *Предопухолевые заболевания желудка*. Л., 1969.
8. Stiller D. — *Z. ges. inn. Med.*, 1968, Bd 23, S. 200—202.
9. Gudmand-Hoyer E., Möllman K. — *Scand. J. Gastroenterol.*, 1975, v. 10, p. 653—656.
10. Simon L., Figus A. — *Digestion Basel*, 1972, v. 7, p. 174—182.
11. Fodden J. — *Gastroenterology*, 1953, v. 23, p. 372—375.
12. Madden K., Pietrolungo A., Torre A. — *Gastroenterology*, 1957, v. 32, p. 1113—1117.
13. Рапопорт С. И., Цирульников Н. Э. — В кн.: *Ферменты в лабораторной диагностике*. М., 1973, т. 4, с. 33—37.
14. Витебский Я. Д. *Хронические нарушения дуоденальной проходимости и язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки*. Челябинск, 1976.

Поступила 9/XII 1978 г.

ACTIVITY OF SOME ENZYMES IN ENTEROLYSED FOCI OF HUMAN GASTRIC MUCOSE IN ULCEROUS DISEASE AND EFFECT OF BILE ON THE ENZYMATIC ACTIVITY

G. G. Ivanov

Laboratory of Surgical Gastroenterology, Central Research Laboratory, Medical School, Sverdlovsk, Regional Hospital, Kurgan

Activities of lactate dehydrogenase /LDH/, glucose-6-phosphate dehydrogenase /G6PD/, transaminases, alkaline phosphatase as well as content of lactic acid were studied in enterolysed parts of gastric mucose and in normal mucose. The LDH activity and content of lactic acid were decreased in the enterolysed mucose. As compared with normal mucose the activity of G6PD was increased 3-fold, activities of alkaline phosphatase and of glutamine-alanine transaminases were increased 1.5-2-fold in the mucose regions with metaplasia. In vitro glycocholic acid and products of duodenal secretion inhibited distinctly G6PD and LDH within 10 min of incubation; maximal activity of G6PD was observed within 20 min, after addition of cholic acid the enzyme was completely inactivated within 30 min. Under these conditions the activity of alkaline phosphatase was decreased within 10 min and returned up to the initial level within the subsequent periods.

УДК 616.155.392-07:616.155.32-00 8.939.633-074

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

КООРДИНАЦИЯ ОСНОВНОГО И РЕУТИЛИЗАЦИОННОГО ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА НУКЛЕОТИДОВ В ЛИМФОЦИТАХ ПРИ ЛЕЙКОЗЕ

Лаборатория биохимии Института гематологии и переливания крови, Ленинград

Особенности нуклеотидного обмена лейкозных лейкоцитов сравнительно слабо освещены в литературе. Опубликованные данные касаются главным образом характеристики размеров пула нуклеотидов [1—3], активности ряда ферментных систем, катализирующих реутилизационный путь их синтеза [4—6], и за небольшим исключением [7—9] практически не содержат информации о синтезе нуклеотидов *de novo*.

Последнее объясняется тем, что после работ [10] утвердилось мнение, согласно которому в лейкоцитах основная часть нуклеотидов образуется реутилизационным путем из преформированных азотистых оснований, и лишь в последние годы были получены отчетливые экспериментальные доказательства осуществления в них синтеза нуклеотидов *de novo* [11—14]. Однако эти данные были получены на клетках, стимулированных фитогемагглютинином. Они свидетельствуют о том, что под влиянием стимулирующего действия митогенных факторов в лейкоцитах нарушается координация обоих путей синтеза нуклеотидов. На основании ряда работ [4, 5] можно предположить, что нарушение координации процессов синтеза нуклеотидов происходит и при лейкозном перерождении кроветворной ткани.

Чтобы получить дополнительные данные об обмене нуклеотидов в лейкозных лейкоцитах, позволяющие судить о механизме нарушения ранних стадий формирования клеточного генома, в лимфоцитах больных с лейкомической формой ХЛЛ исследовали обменные превращения оротовой кислоты и уридина, завершающиеся синтезом уридиновых нуклеотидов и РНК.

Оротовая кислота является интермедиатом конечных стадий синтеза нуклеотидов *de novo* и в последовательно протекающих реакциях с ОМФ-пирофосфорилазой и ОМФ-декарбоксилазой превращается в уридинмонофосфат.

В отличие от оротовой кислоты уридин вовлекается в синтез нуклеотидов, подвергаясь прямому фосфорилированию под влиянием уридинкиназы.

Задачей работы являлось изучение включения ^{14}C -оротовой кислоты и ^{14}C -уридина в пул свободных уридиновых нуклеотидов (моно-, ди-, трифосфатов) и в РНК, а также определение активности ключевых ферментов биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов — ОМФ-пирофосфорилазы и уридинкиназы.

Методы

Лейкоциты выделяли из периферической крови с помощью желатино-цитратного раствора, суспендировали в кребс-рингер-фосфатном буфере рН 7,4, содержащем ЭДТА в конечной концентрации 0,1%, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч с мечеными предшественниками нуклеотидов. Подробный состав инкубационной системы приведен в табл. 1. О синтезе *de novo* судили по включению в пул нуклеотидов и РНК ^{14}C -оротовой кислоты; реутилизационный путь синтеза оценивали по включению ^{14}C -уридина в эти соединения.

Таблица 1

Включение ^{14}C -оротовой кислоты и ^{14}C -уридина в кислоторастворимые нуклеотиды и РНК лимфоцитов в норме и при ХЛЛ (в имоль/мг ДНК в 1 ч)

Обследуемые	Уридинди- и уридинтрифосфаты			Уридинмонофосфаты			РНК		
	^{14}C -оротовая кислота	^{14}C -оротовая кислота + уридин	^{14}C -уридин	^{14}C -оротовая кислота	^{14}C -оротовая кислота + уридин	^{14}C -уридин	^{14}C -оротовая кислота	^{14}C -оротовая кислота + уридин	^{14}C -уридин
Здоровые доноры	662±123	541±77	2 000±250	550±68	347±40	1 099±99	197±25	201±30	298±42
Больные ХЛЛ	858±150	877±98	12 000±1400	434±18	407±56	2 408±235	278±33	239±28	854±102

Примечание. Состав опытных проб (в мкмоль): глицин—5; никотинамид—5; NaHCO_3 —15; АТФ—2,5; глюкоза—50; оротовая- ^{14}C кислота или уридин- ^{14}C —1 (ударная радиоактивность соответственно $1,8 \cdot 10^6$ и $3 \cdot 10^6$ имп/мин/мкмоль); 0,15 мл кребс-рингер-фосфатного буфера рН 7,4; 0,50 мл суспензии лимфоцитов (10^6 клеток). Объем проб—1 мл. Инкубация в течение 60 мин при 37°C в сосудах Варбурга. Представлены средние величины 16 опытов.

После инкубации клетки отмывали физиологическим раствором с ЭДТА и дважды экстрагировали при 0°C 0,5 М HClO_4 . Нейтрализованные экстракты высушивали в эксикаторе над КОН под вакуумом. Осадки растворяли в воде и подвергали хроматографическому разделению на ватмане № 3 ММ в течение 18 ч, используя смесь 1 М уксуснокислого аммония этанолом (7 : 3), рН 7,5. Радиоактивность пятен хроматограммы, вырезанных в соответствии с положением нуклеотидов-«свидетелей», просчитывали в сцинтилляционном счетчике СБС-1.

Радиоактивность РНК определяли после щелочного гидролиза кислотонерастворимого осадка клеток [15]. Результаты выражали в пикомолях уридина или оротовой кислоты, включившихся в нуклеотиды или РНК, в расчете на 1 мг ДНК за 1 ч. Содержание ДНК в лейкоцитах определяли по Бартону [16].

Активность ОМФ-пирофосфорилазы и уридинкиназы определяли по количеству УМФ, синтезированного в реакциях, катализируемых этими ферментами. Последний изолировали путем фиксации на хроматографической бумаге, импрегнированной 0,1 М раствором хлористого лантана.

При определении активности ОМФ-пирофосфорилазы в реакционную смесь добавляли препарат ОМФ-декарбоксилазы (КФ 4.1.1.23., оротидин-5'-фосфат-карбоксилиаза), выделенной из пекарских дрожжей [17]. Препарат фосфорибозил пирофосфата синтезировали в лаборатории [18]. Состав реакционной смеси для определения активности ОМФ-пирофосфорилазы и уридинкиназы указан в примечании к табл. 2.

Результаты исследования

Скорость реутилизационного пути синтеза нуклеотидов в лейкоцитах значительно превышает скорость их синтеза *de novo*. Так, по данным табл. 1, в лимфоцитах здоровых людей ^{14}C -уридин включается в уридинди- и уридинтрифосфаты почти в 3 раза, а в РНК — в 1,5 раза быстрее, чем оротовая кислота.

Лейкозное перерождение клеток в большей степени затрагивает метаболизм уридина, чем оротовой кислоты. Как видно из представленных данных, развитие ХЛЛ сопровождается по крайней мере 6-кратным увеличением скорости включения уридина в уридинди- и уридинтрифосфаты и 3-кратным — в РНК лимфоцитов при незначительном увеличении скорости включения оротовой кислоты (в 1,3—1,4 раза) в эти соединения.

Представленные данные показывают, что в лейкозных лимфоцитах преобладание реутилизационного пути синтеза пиримидиновых нуклеотидов становится еще более заметным, так как по сравнению с оротовой кислотой включение уридина в уридинди- и уридинтрифосфат увеличивается в 14 раз, а в РНК — в 3 раза.

Т а б л и ц а 2

Активность ОМФ-пирофосфорилазы и уридинкиназы в лейкоцитах в норме и при ХЛЛ (в мкмоль превращаемого субстрата на 1 г белка в 1 мин)

Обследуемые	ОМФ-пирофосфорилаза					Уридинкиназа
	без добавок	+ уридин	+ уридинмо- нофосфат	+ уридин- дифосфат	+ уридин- трифосфат	
Больные ХЛЛ	10,4±0,8	8,3±0,9	10,7±1,2	8,4±1,9	6,2±0,4	3,9±0,5
Здоровые доно- ры	7,7±0,8					2,5±0,4
Число опытов	8	7	7	4	7	5

П р и м е ч а н и е. Состав реакционной смеси для определения активности ОМФ-пирофосфорилазы: 0,3 мл 0,1 М Na_2HPO_4 pH 7,5; 0,4 мл 0,1 М ФРПФ; 0,1 мл 0,001 М ^{14}C -оротовой кислоты (удельная радиоактивность $1,8 \cdot 10^6$ имп/мин на 1 мкмоль). Объем проб — 1. Инкубация в течение 15 мин при 37°C в сосудах Варбурга. Состав проб для определения активности уридинкиназы: 0,1 мл 0,5 М трис-буфера pH 7,5; 0,05 мл 0,2 М MgCl_2 ; 0,05 мл 25 М АТФ. Инкубация в течение 2 мин при 30°C. В качестве ферментативного источника использовали экстракты ацетоновых порошков лимфоцитов, которые готовили настаиванием в течение 20 мин (5 мг порошка +1 мл 0,05 М трис-буфера). При определении активности ОМФ-пирофосфорилазы в реакционную смесь вводили 0,2 мл, при определении активности уридинкиназы — 0,05 мл экстракта.

Среди компонентов внутриклеточного пула нуклеотидов радиоактивная метка уридина и оротовой кислоты распределяется неравномерно. Особенно отчетливо это обнаруживается в лейкозных лейкоцитах, где 70—80% ее открывается в нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатах. Это является убедительным аргументом в пользу того, что в лейкозных лейкоцитах обмен уридиновых нуклеотидов сдвигается в сторону образования непосредственных предшественников РНК.

Подтверждением этого могут служить также данные об активности ключевых ферментов обмена оротовой кислоты и уридина — ОМФ-пирофосфорилазы и уридинкиназы. Оказалось, что в лейкозных лейкоцитах она приблизительно на 30% выше, чем в нормальных (см. табл. 2).

Таким образом, исследование ферментативной активности показывает, что увеличение скорости обмена оротовой кислоты и уридина в лимфоцитах больных ХЛЛ действительно обусловлено более высокой, чем в норме, активностью ферментов, от которых зависят эти процессы.

При анализе табл. 2 обращает на себя внимание тот факт, что, хотя оротовая кислота в лейкозных лимфоцитах метаболизируется значительно медленнее, чем уридин, активность ОМФ-пирофосфорилазы в 2—3 раза превышает таковую уридинкиназы.

Одним из факторов, влияющих на активность ОМФ-пирофосфорилазы, как видно из табл. 2, является внутриклеточная концентрация уридиновых нуклеотидов. В присутствии уридина и уридиндифосфата активность фермента подавляется на 20%. Большее действие, чем уридин, оказывает уридинтрифосфат, угнетающий в той же концентрации активность ОМФ-

пирофосфорилазы на 40%. Следовательно, активность ОМФ-пирофосфорил азы регулируется путем, зависящим от уровня уридиновых нуклеотидов, и повышение последнего способствует ограничению активности фермента. На ингибирование ОМФ-пирофосфорилазы в присутствии экзогенного уридина обратили внимание еще Блейер и Поттер [19].

Однако ингибирующее влияние уридина и уридиновых нуклеотидов на ОМФ-пирофосфорилазу отчетливо обнаруживается лишь в клеточных экстрактах. На уровне интактных клеток его не удается обнаружить. Как видно из табл. 1, поступление немеченого уридина в лейкозные клетки не сопровождается даже разведением метки, которого следовало бы ожидать как результат вовлечения немеченого уридина в синтез нуклеотидов и РНК.

Отсутствие изменений радиоактивности нуклеотидов и РНК, по-видимому, свидетельствует о накоплении нуклеотидов в лейкозных клетках. В соответствии с данными, полученными на клетках гепатомы Новикова [20, 21], это может происходить вследствие блокирования уридиновыми нуклеотидами активности ферментных систем, катализирующих их превращения в цитидиновые нуклеотиды. Снижение содержания цитидинмонофосфата по сравнению с уридинмонофосфатом в лимфоцитах селезенки лейкозных мышей подтверждается и в недавно опубликованной работе [22].

Резюмируя полученные данные, следует обратить внимание на то, что обмен нуклеотидов в лимфоцитах периферической крови больных ХЛЛ имеет ряд отличительных особенностей. К их числу относится приблизительно 6-кратное увеличение по сравнению с нормальными лимфоцитами скорости реутилизационного пути синтеза из уридина при незначительном увеличении скорости синтеза нуклеотидов из оротовой кислоты (см. табл. 1).

Различие скоростей обоих процессов синтеза может быть следствием относительно высокой активности уридинкиназы лейкозных клеток (см. табл. 2), что приводит к увеличению пула уридиновых нуклеотидов. Последние оказываются ингибиторами ОМФ-пирофосфорилазы и ограничивают скорость синтеза пиримидиновых нуклеотидов *de novo*. Эти процессы в лейкозных лейкоцитах сопровождаются нарушением координации реутилизационного и основного путей синтеза пиримидиновых нуклеотидов. Увеличение размеров пула уридиновых нуклеотидов в опухолевых клетках [23], а также активирование уридинкиназы при неопластических заболеваниях [24] наблюдали и другие исследователи.

О возможности подавления синтеза пиримидиновых нуклеотидов *de novo* и замещения его реутилизационным путем свидетельствуют работы [11—13]. Авторы смогли продемонстрировать в лимфоцитах, стимулированных фитогемагглютинином, подавление активности карбамилфосфатсинтетазы под влиянием уридинтрифосфата и на этом основании предположили, что замещение одного пути синтеза другим может происходить на стадии, катализируемой этим ферментом. По данным настоящей работы, процесс замещения путей синтеза пиримидиновых нуклеотидов в лейкозных лимфоцитах может происходить и на конечной стадии синтеза *de novo*, зависящей от ОМФ-пирофосфорилазы.

Вопрос о механизме регуляции активности ОМФ-пирофосфорилазы окончательно не решен [25, 16]. Не установлено, является ли этот фермент аллостерическим белком и образует ли он обратную связь с конечными продуктами реакции. Высказывается предположение, что основным механизмом регуляции его активности является механизм репрессии [25]. Однако при этом не исключаются адаптивные изменения активности под влиянием уридиновых нуклеотидов и ФРПФ [26].

Синтез РНК, оцениваемый по включению уридина и оротовой кислоты в молекулы этого полимера, зависит от скорости включения радиоактивной метки в нуклеотиды (см. табл. 1), что согласуется с ранее опубликованными данными [27]. В лейкозных лимфоцитах при активной пролиферации кровяной ткани он поддерживается главным образом за счет реутилизационного пути синтеза пиримидиновых нуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Луганова И. С., Сейц И. Ф. — Бюлл. exper. биол., 1971, № 6, с. 41—43. —
2. May S., Zdebska E., Daszynski J. — Folia Haemat. (Lpz.), 1973, Bd 99, S. 157—169. — 3. Fields F., Brox L. — Canad. J. Biochem., 1974, v. 52, p. 441—446. —
4. Davidson J. D., Winter T. S. — Cancer Res., 1964, v. 24, p. 261—267. — 5. Rosman M., Williams H. S. — Ibid., 1973, v. 33, p. 1202—1209. — 6. Dietz A. A., Czebotar V. — Ibid., 1977, v. 37, p. 419—426. — 7. Prager M. D., Bryan S. E., Hill J. M. et al. — Blood, 1963, v. 22, p. 815—821. — 8. Bresnick E., Karjala R. J. — Cancer Res., 1964, v. 24, p. 841—846. — 9. Cooper A., Ferry S., Breitman T. S. — Ibid., 1966, v. 26, p. 2267—2275. — 10. Lajtha L. G., Vane J. N. — Nature, 1958, v. 191, p. 182. — 11. Tatibana M., Ito E. — J. biol. Chem., 1969, v. 244, p. 5403—5413. —
12. Ito K., Uchino H. — Ibid., 1971, v. 246, p. 4060—4065. — 13. Ito K., Uchino H. — Ibid., 1973, v. 248, p. 398—392. — 14. Moreolongo R., Pompucci G., Micheli K. — Experientia (Basel), 1975, v. 31, p. 1187. — 15. Forsdyke D. R. — Biochem. J., 1967, v. 105, p. 679—684. — 16. Бартон К. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., 1970, с. 7—12. — 17. Creasy R. E., Handschumacher W. A. — J. biol. Chem., 1961, v. 236, p. 2058—2061. — 18. Филиппова В. Н., Филиановская Л. И. — Вopr. мед. химии, 1975, т. 21, № 6, с. 663—665. — 19. Blair D. G. R., Potter V. R. — J. biol. Chem., 1961, v. 236, p. 2502—2506. — 20. Hurlbert R. B., Kammen H. G. — Ibid., 1960, v. 235, p. 334—449. — 21. Hurlbert R. B. — Fed. Proc., 1960, v. 19, p. 308. — 22. Герасимова Г. К., Мокина В. Д., Сидорова Г. А. — Биохимия, 1978, т. 43, № 1, с. 163—169. — 23. Keppler D. O. R., Smith D. F. — Cancer Res., 1974, v. 34, p. 705—708. — 24. Greenberg N., Schumm D. S., Webb T. E. — Biochem. J., 1977, v. 164, p. 379—382. — 25. Jones M. E. — Advanc. Enzyme Regulat., 1974, v. 12, p. 19—25. — 26. Sweeney M. J., Parton J. W., Hoffman D. H. — Ibid., p. 385—396. — 27. Lewan L., Peterson I., Ynger T. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1975, Bd 336, S. 425—429.

Поступила 20/XI 1978 г.

COORDINATION BETWEEN THE MAIN AND REUTILIZATIONAL PATHWAYS OF NUCLEOTIDE BIOSYNTHESIS IN LYMPHOCYTES UNDER LEUKOSIS

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

Laboratory of Bioshemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion,
Leningrad

Coordination of these two pathways of nucleotide synthesis in leukocytes under chronic lympholeukosis was studied using incorporation of ^{14}C -orotic acid and ^{14}C -uridine into uridine mono-, di- and triphosphates and also into RNA. Simultaneously, activity of the key enzymes, participating in metabolism of orotic acid and of uridine, was measured: OMP-pyrophosphorylase /EC 2.4.2.10, orotidine-5'-phosphate: purorophosphate phosphorybosyl transferase/ and uridine kinase /EC 2.7.1.48, ATP: uridine-5'-phosphotransferase/. The reutilizational pathway of pyrimidine nucleotide synthesis was distinctly activated. At the same time there was only a slight increase in the main pathway of their synthesis in lymphocytes in leukemic form of chronic lympholeukosis. Activities of OMP-pyrophosphorylase and uridine kinase were increased by 30%. An impairment in the coordination of the rates of both pathways of pyrimidine nucleotide synthesis was related to inhibition of OMP-pyrophosphorylase caused by and increase in uridine nucleotide pool.

УДК 617-001.17-092.9-085.356:577.161.3-07:616-008.931-07

В. Г. Мхитарян, М. И. Агаджанов, П. А. Казарян

ВЛИЯНИЕ α -ТОКОФЕРОЛА НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА И РАСПАДА ФОСФОЛИПИДОВ ПРИ ОЖГОВОЙ ТРАВМЕ

Кафедра биохимии Ереванского медицинского института, Центральная научно-исследовательская лаборатория Ереванского института усовершенствования врачей

В предыдущих исследованиях [1, 2] было показано, что при ожоговой травме в организме резко возрастает содержание липидных перекисей. Наряду с этим были обнаружены также заметные изменения в содержании эндогенного α -токоферола и значительные изменения фракционного и жирнокислотного состава фосфолипидов биологических мембран [3, 4].

Усиление перекисного окисления липидов, дефицит антиоксидантов, а также низкая активность супероксиддисмутазы наряду с другими факторами и особенно воздействием со стороны нейроэндокринной системы могут являться теми пусковыми механизмами, которые лежат в основе патогенеза ожоговой болезни.

Липидные перекиси и свободные радикалы, как и дефицит α -токоферола, вызывают многочисленные изменения в активности целого ряда ферментов, особенно мембраносвязанных, и приводят к нарушению обменных процессов.

Нами установлено [5, 6], что низкое содержание фосфолипидов и высокий уровень липидных перекисей в печени и мозге после ожога нормализуются при введении витамина Е. В связи с этим было небылзптересно изучить активность некоторых ферментов, ответственных за биосинтез и распад фосфолипидов, и выяснить роль витамина Е в этом процессе.

Методика

Опыты проводили на белых крысах-самках массой 130—160 г. Ожог вызывали по ранее описанной методике [1]. Исследования проводили через 1 ч, 1, 3, 7 и 15 дней после ожоговой травмы. Витамин Е вводили крысам внутрйбрюшинно в количестве 1 мг на 1 кг массы животного сразу после ожога, затем через 3, 7 и 12 дней. Головной мозг и печень извлекали и обрабатывали на холоду. В опыте использовали надмитохондриальную жидкость, полученную после центрифугирования при 17 000 g [7].

Активность глицерокиназы (КФ 2.7.1.30) L- α -глицерофосфатдегидрогеназы — ГФДГ (КФ 1.1.1.8) (прямая реакция) и количество L- α -глицерофосфата определяли микроспектрофотометрическим методом Кеннеди [8]. Активность глицерокиназы определяли в реакционной среде следующего состава: 0,94 мл дистиллированной воды, 1,8 мл $MgCl_2$ -гидразин-глицинового буфера рН 9,8, 0,05 мл 0,02 М НАД, 0,014 мл ГФДГ (140 мкг кристаллического белка), 0,05 мл 0,075 М АТФ, 0,05 мл 0,1 М глицерина и 0,1 мл смеси микросомальной и растворимой фракций исследуемой ткани. Общйй объем реакционной смеси составлял 3 мл. Активность ГФДГ определяли по окислению L- α -глицерофосфата в таком же объеме инкубационной среды, состоящей из 0,94 мл дистиллированной воды, 1,8 мл $MgCl_2$ -гидразин-глицинового буфера рН 9,8, 0,05 мл 0,02 М НАД, 0,2 мл 0,1 М раствора L- α -глицерофосфата и 0,01 мл смеси микросомальной и растворимой фракций. Определение содержания L- α -глицерофосфата проводили также в 3 мл инкубационной среды, содержащей 0,94 мл дистиллированной воды, 1,8 мл $MgCl_2$ -гидразин-глицинового буфера рН 9,8, 0,05 мл 0,02 М НАД, 0,014 мл ГФДГ и 0,2 мл безбелкового нейтрализованного экстракта исследуемой ткани.

Активность фосфолипазы А (КФ 3.1.1.4) определяли в сыворотке крови по методу Тужилина и Салуэнья [9]. С целью исключения колебания количества субстрата в пробе вместо разбавленного яичного желтка использовали определенное количество фосфолипидов, выделенных из яичного желтка по Фолчу и соавт. [10].

Результаты и обсуждение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что у крыс через 1 ч после ожога активность глицерокиназы в головном мозге и печени повышается соответственно на 48 и 20% (табл. 1 и 2). Несмотря на это, содержание L- α -глицерофосфата в мозге находится в пределах исходного уровня, а в печени даже снижается на 38 6% (см. табл. 2) вследствие высокой скорости окисления до диоксиацетонфосфата (ДОАФ), что подтверждается повышением активности ГФДГ в головном мозге на 98,5%, а в печени на 44,5%. Таким образом, через 1 ч после ожога активируется как глицерокиназа, так и ГФДГ. Сопоставляя полученные данные, можно допустить, что глицерофосфат, образующийся в глицерокиназной реакции, мало вовлекается в биосинтез фосфолипидов и в основном включается после окисления в ДОАФ в процесс гликолиза и гликонеогенеза, что подтверждается низким уровнем фосфолипидов в печени и мозге [3]. Интересно, что в этот срок активность фосфолипазы А в сыворотке крови практически не меняется (табл. 3).

Как это видно из данных табл. 1 и 2, на фоне введения экзогенного витамина Е, активность ферментов спустя 1 ч после ожога приближается

Т а б л и ц а 1

Влияние α -токоферола на содержание L- α -глицерофосфата, активность глицерокиназы и ГФДГ (прямая реакция) в мозге крыс при ожоговой травме

Срок исследования после ожога	L- α -глицерофосфат, мкмоль на 1 г влажной ткани			Глицерокиназа, мкмоль НАД·Н мин на 1 г влажной ткани			ГФДГ		
	контроль	ожог	ожог + α -токо- ферол	контроль	ожог	ожог + α -токо- ферол	контроль	ожог	ожог + α -то- коферол
1 ч P	$0,36 \pm 0,017$ (10)	$0,39 \pm 0,02$ (11)	$0,32 \pm 0,019$ (9) <0,01	$0,25 \pm 0,011$ (10)	$0,37 \pm 0,013$ (10) <0,001	$0,27 \pm 0,014$ (10) <0,001	$1,35 \pm 0,05$ (10)	$2,68 \pm 0,12$ (9) <0,001	$1,63 \pm 0,08$ (11) <0,001
1 день P		$0,26 \pm 0,016$ (10) <0,001	$0,57 \pm 0,022$ (11) <0,001		$0,20 \pm 0,010$ (9) <0,01	$0,39 \pm 0,016$ (9) <0,001		$1,21 \pm 0,07$ (10) >0,05	$2,46 \pm 0,13$ (9) <0,001
3 дня P		$0,59 \pm 0,03$ (9) <0,001	$0,34 \pm 0,02$ (9) <0,001		$0,37 \pm 0,015$ (10) <0,001	$0,61 \pm 0,017$ (11) <0,001		$0,95 \pm 0,05$ (11) <0,001	$1,59 \pm 0,07$ (11) <0,001
7 дней P		$0,35 \pm 0,021$ (10)	$0,24 \pm 0,012$ (11) <0,001		$0,22 \pm 0,010$ (10) >0,05	$0,53 \pm 0,014$ (11) <0,001		$1,10 \pm 0,06$ (9) <0,01	$2,07 \pm 0,15$ (10) <0,001
15 дней P		$0,24 \pm 0,013$ (9) <0,001	$0,42 \pm 0,027$ (10) <0,001		$0,19 \pm 0,010$ (11) <0,001	$0,67 \pm 0,019$ (9) <0,001		$1,31 \pm 0,09$ (11) >0,05	$2,65 \pm 0,16$ (9) <0,001

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2. в скобках — число животных.

Таблица 2

Влияние α -токоферола на содержание L- α -глицерофосфата, активность глицерокиназы ГФДГ в печени крыс при ожоговой травме

Срок исследования после ожога	L- α -глицерофосфат, мкмоль на 1 г влажной ткани			Глицерокиназа, мкмоль НАДН/мин на 1 г влажной ткани			ГФДГ	ГФДГ мкмоль НАДН/мин/г ткани	
	контроль	ожог	ожог + α -токоферол	контроль	ожог	ожог + α -токоферол	контроль	ожог	ожог + α -токоферол
	1,97 \pm 0,034 (10)			0,95 \pm 0,017 (10)			7,01 \pm 0,12 (10)		
1 час		1,21 \pm 0,047 (10)	1,84 \pm 0,027 (11)		1,14 \pm 0,021 (9)	0,94 \pm 0,025 (10)		10,1 \pm 0,18 (9)	8,96 \pm 0,17 (11)
P		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001
1 день		1,42 \pm 0,034 (11)	2,80 \pm 0,035 (9)		0,70 \pm 0,017 (10)	1,47 \pm 0,037 (11)		5,67 \pm 0,15 (10)	10,4 \pm 0,20 (11)
P		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001
3 дня		1,67 \pm 0,03 (10)	1,07 \pm 0,033 (10)		0,82 \pm 0,018 (11)	0,10 \pm 0,024 (9)		8,60 \pm 0,16 (11)	13,9 \pm 0,20 (9)
P		<0,001	<0,001		>0,001	<0,001		<0,001	<0,001
7 дней		2,08 \pm 0,034 (10)	1,66 \pm 0,02 (9)		1,23 \pm 0,023 (10)	1,43 \pm 0,013 (9)		8,42 \pm 0,17 (10)	6,32 \pm 0,18 (9)
P		<0,05	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001
15 дней		1,78 \pm 0,021 (11)	1,88 \pm 0,034 (10)		0,90 \pm 0,013 (9)	1,44 \pm 0,018 (10)		9,91 \pm 0,16 (9)	7,07 \pm 0,18 (11)
P		<0,001	>0,05		>0,05	<0,001		<0,001	<0,001

к исходному уровню. При этом содержание глицерофосфата нормализуется как за счет подавления его окисления в ДОАФ, так и за счет активации глицерокиназного пути биосинтеза, в результате чего, как было установлено ранее, содержание фосфолипидов достигает исходного уровня.

Через один день после ожога количество глицерофосфата снижается в мозге и печени, одновременно угнетается также активность глицерокиназы и ГФДГ. Интересно, что в этот срок резко (на 41 %) повышается активность фосфолипазы А в сыворотке крови, что сопровождается увеличением содержания лизолецитинов. Таким образом, низкое содержание фосфолипидов в тканях при ожоговой травме обусловлено угнетением активности ферментов начального этапа их биосинтеза и активацией фосфолипазы А.

Таблица 3

Влияние α -токоферола на активность фосфолипазы А (в ед. фосфолипазы А на 1 мл сыворотки) в сыворотке крови крыс при ожоговой травме

Срок исследования после ожога	После ожога		После ожога + α -токоферол	
	$M \pm m$	P	$M \pm m$	P
Контроль	$1,03 \pm 0,056$		$1,02 \pm 0,056$	
1 ч	$1,09 \pm 0,065$	$>0,05$	$1,69 \pm 0,08$	$>0,05$
1 день	$1,46 \pm 0,077$	$<0,001$	$1,69 \pm 0,08$	$<0,001$
3 дня	$1,24 \pm 0,050$	$<0,02$	$1,46 \pm 0,09$	$<0,001$
7 дней	$1,39 \pm 0,10$	$<0,001$	$0,99 \pm 0,05$	$>0,05$
15 "	$0,73 \pm 0,04$	$<0,001$	$1,05 \pm 0,06$	$>0,05$

Примечательно, что при введении витамина Е значительно повышается активность ферментов и возрастает содержание глицерофосфата — необходимого компонента для биосинтеза фосфолипидов.

Полученные данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований и объясняют высокий уровень фосфолипидов в печени и мозге

обожженных крыс после введения α -токоферолаацетата.

Интересно, что хотя на фоне введения витамина Е через день после ожога активность фосфолипазы А в крови повышается, однако содержание лизолецитинов не возрастает, возможно, вследствие активации и остальных фосфолипаз, что косвенно подтверждается высоким содержанием этаноламина в печени и мозге обожженных крыс.

Исследования, проведенные спустя 3 дня после ожога, показали, что у крыс содержание глицерофосфата в мозге повышается на 63,9 % вследствие активации глицерокиназы и угнетения ГФДГ. Эти изменения в печени имеют противоположную направленность и менее выражены, что и приводит к относительно низкому содержанию в ней глицерофосфата. Активность фосфолипазы А в крови остается по-прежнему высокой, вследствие чего повышается также содержание лизолецитинов. Мы допускаем, что низкая разистентность эритроцитов у обожженных обусловлена наряду с некоторыми другими факторами избыточной пероксидацией фосфолипидов биомембран, а также увеличением содержания лизолецитинов вследствие высокой активности фосфолипазы А в крови.

Хотя при введении экзогенного α -токоферола в мозге стимулируется активность обоих ферментов, особенно глицерокиназы, однако содержание глицерофосфата находится в пределах исходного уровня. В печени же, наоборот, активность ГФДГ повышается в большей степени, что приводит к заметному снижению содержания глицерофосфата.

С удлинением послеожогового периода до 7 дней активность ферментов, участвующих в обмене глицерофосфата, и содержание самого глицерофосфата изменяются неодинаково. В мозге активность глицерокиназы и ГФДГ несколько снижается, а в печени, наоборот, повышается, однако содержание глицерофосфата как в мозге, так и в печени остается в пределах нормы. Интересно, что изменения в скорости образования и окисления глицерофосфата не совпадают с изменениями в содержании самого глицерофосфата, тогда как уровень фосфолипидов в этих условиях, как нами было установлено ранее, понижен. Этот факт мы склонны объяснить замедлением процесса биосинтеза фосфатидной кислоты из глицерофосфата, возможно, вследствие угнетения активности глицерофосфатацилтрансферазы, а так-

же усилением расщепления фосфолипидов за счет активации фосфолипазы А.

Примечательно, что через 15 дней после ожога все изучаемые показатели, за исключением активности ГФДГ, в печени снижаются несколько ниже контрольного уровня (см. табл. 2).

Как видно из данных табл. 1 и 2, при введении α -токоферилацетата происходят выраженные изменения в активности изучаемых ферментов как на 7-й, так и на 15-й день. Так, активность глицерокиназы и ГФДГ в мозге возрастает в 2—3 раза, в то время как в печени активность этого фермента повышается на 50%, а ГФДГ, наоборот, понижается по сравнению с обожженными животными, не получавшими витамина Е. При этом содержание глицерофосфата изменяется незначительно. Допускается, что близкое к исходному уровню содержание глицерофосфата на фоне резкой активации глицерокиназного пути его образования связано с повышением скорости включения глицерофосфата в последующие этапы биосинтеза фосфатидов, что подтверждается высоким содержанием фосфолипидов в тканях при тех же сроках под влиянием витамина Е [3]. Таким образом, полученный экспериментальный материал свидетельствует о благоприятном влиянии α -токоферола на обмен фосфолипидов посредством ферментов начального этапа биосинтеза фосфатидов, а также упорядочения его расщепления фосфолипазами.

Полученные данные хорошо согласуются с нашими предыдущими исследованиями, где было показано значительное усиление процесса липидной перекисидации при ожоговой травме [1]. Перекисному окислению подвергаются в первую очередь ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов, и, если этот процесс заходит достаточно далеко, практически все фосфолипиды оказываются окисленными [11]. Небезынтересно, что окисленные фосфолипиды легче атакуются фосфолипазами. Липидные перекиси [12], окисляя фосфатиды, одновременно нарушают конформацию связанных с ними белков и тем самым повышают проницаемость мембран. Об этом свидетельствует появление в крови при ожоге органоспецифических ферментов печени — гистидазы, урокиназы и триптофанпирролазы [13,14].

α -Токоферол, будучи антиоксидантом, предохраняет фосфолипиды от окисления, чем и обеспечивает выполнение ими их биологической функции.

Исследованиями последних лет [15] показано, что фосфолипиды выступают в роли типичных аллостерических эффекторов, поэтому вполне возможно, что изменение количества фосфолипидов под влиянием возросшего при ожоговой травме уровня липидных перекисей может осуществлять аллостерическую регуляцию всего процесса биосинтеза фосфолипидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М. И., Мхитарян В. Г., Мелик-Агаян Е. А. — В кн.: Всесоюзный биохимический съезд. 3-й. Рефераты научных сообщений. Рига, 1974, т. 1, с. 242.
2. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. — Ж. exper. и клин. мед., 1975, т. 15, № 1, с. 3.
3. Агаджанов М. И. — Биол. ж. Армении, 1978, т. 31, № 2, с. 128.
4. Агаджанов М. И., Ерицян Л. Н., Черкасов А. И. и др. — Там же, № 6, с. 561.
5. Агаджанов М. И., Овакимян С. С., Мхитарян В. Г. и др. — Укр. біохімі. ж., 1978, № 6, с. 726.
6. Агаджанов М. И. — Ж. exper. и клин. мед., 1977, т. 17, № 5, с. 68.
7. Казарян П. А., Карагезян К. Г. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1974, т. 9, с. 75.
8. Kennedy E. P. — Meth. Enzymol., 1962, v. 5, p. 476.
9. Тузилина С. А., Салузьян А. И. — Лабор. дело, 1975, № 6, с. 334.
10. Folch C. B., Lees M., Sloane Stanley J. H. — J. biol. Chem., 1957, v. 226, p. 497.
11. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972, с. 72.
12. Тарусов Б. Н. — В кн.: Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии. М., 1976, с. 176.

13. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Межелумян Л. М. — Ж. exper. и клин. мед., 1977, т. 17, № 2, с. 16.
14. Агаджанов М. И., Семердзян Л. В., Мхитарян В. Г. — Там же, № 3, с. 8.
15. Бурлакова Е. Б. — В кн.: Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М., 1977, с. 16.

Поступила 23/XI 1978 г.

EFFECT OF α -TOCOPHEROL ON THE ACTIVITY OF CERTAIN ENZYMES OF PHOSPHOLIPID BIOSYNTHESIS AND ITS IMPAIRMENT IN BURNS

V. G. Mkhitarian, M. I. Agadjanov, P. A. Kazarian

Department of Biochemistry, Medical School, Institute of Advanced training of physicians, Yerevan

Burns affected the content of L- α -glycerophosphate /L- α -GP/ in rats; its level was reduced within 15 days after burns. Phasic changes in L- α -glycerophosphate dehydrogenase and glycerokinase activities in liver and brain tissues and phospholipase A in blood were also observed. Intraperitoneal administration of α -tocopheryl acetate into rats subjected to burns abolished the decrease in content of L- α -GP although the activity of the drug varied within this 15 day period. In brain the activity of these enzymes was increased 2-3-fold. The data obtained are in good agreement with those published previously and indicating loss of phospholipids in liver and brain tissue following burns.

УДК 615.217.32.015.1:[546.46+546.41+577.152.361

Е. В. Семенов, С. С. Крылов

УЧАСТИЕ ИОНОВ Mg^{2+} , Ca^{2+} И СООТВЕТСТВУЮЩИХ АТФ-АЗ В МЕХАНИЗМЕ ПРЕСИНАПТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АМИЗИЛА И АРЕКОЛИНА

Институт токсикологии Министерства здравоохранения СССР, Ленинград

Высвобождение ацетилхолина и норадреналина из тканевых депо рассматривается в настоящее время как кальцийзависимый процесс, связанный с избыточным накоплением ионов Ca^{2+} в пресинаптических структурах [1, 2]. Показано [3—5], что холинолитики способны оказывать на клеточные мембраны действие, сходное с действием ионов Ca^{2+} . Центральные холинолитик амизил (бенактизин) влияет на пресинаптические образования головного мозга, в результате чего увеличивается высвобождение нейромедиаторов из тканевых депо [6, 7]. В исследованиях с изолированными из мозга крыс синапсомы [8] было установлено, что амизил ускоряет выход ацетилхолина и норадреналина из них, и высказано предположение о непосредственном замещении амизилом медиаторов в их хранилищах. Принимая во внимание, что разные холинолитики вызывают высвобождение медиаторов [7], трудно предположить, что эти соединения, различающиеся структурой, в одинаковой мере могут замещать как ацетилхолин, так и норадреналин в тканевых депо. Кроме того, в названной выше работе [8] нельзя исключить влияние ионов Ca^{2+} на выход медиаторов из нервных окончаний, так как в данном эксперименте средой инкубации служил раствор Кребса — Рингера, в состав которого входит кальций ($CaCl_2$) в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М.

Холиномиметик ареколин не оказывает высвобождающего нейромедиаторы действия, а по ряду данных [9] даже способствует накоплению ацетилхолина в пресинаптических образованиях. Механизм этого эффекта остается неясным.

С учетом сказанного, а также того, что удержание нейромедиаторов в тканевых депо связывается с присутствием ионов Mg^{2+} [10], в данной работе изучено влияние амизила и ареколина на содержание ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , а также активность Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимых АТФ-аз мембран нервных окончаний головного мозга крыс.

Методика

Опыты проводили на белых крысах массой 150—200 г. Амизил (40 мг/кг) и арсеколин (2,5 мг/кг) вводили внутривенно из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела. Контрольным животным вводили воду. После декапитации животных мозг извлекали и по возможности освобождали от крови.

Фракцию нервных окончаний (синапсом) выделяли в градиенте плотности сахарозы [11]. Активность Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимых АТФ-аз определяли в 0,03 М имидазольном буфере pH 7,4 в присутствии Na^+ (100 мМ), K^+ (20 мМ), Ca^{2+} или Mg^{2+} (5 мМ) с добавлением строфантина К (оубаин, 10^{-4} М). Контрольные пробы содержали все ингредиенты, исключая ионы. После добавления в инкубационную смесь АТФ (3 мМ) пробы выдерживали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением равного объема (2 мл) 10% ТХУ. Пробы центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли неорганический фосфат (P_i), используя молибдат аммония и 1% аскорбиновую кислоту. Белок определяли по Лоури [12]. Содержание электролитов в синапсоме определяли на пламенном спектрофотометре фирмы «Perkin—Elmer» [13].

В опытах *in vitro* синапсомы готовили по методу [14]. К 1 мл полученной суспензии добавляли амизил или арсеколин в конечной концентрации $1,1 \cdot 10^{-6}$ и $1,6 \cdot 10^{-6}$ М соответственно. Пробы инкубировали 15 мин при 30°C, после чего добавляли ^{45}Ca (0,5 мкКи) и инкубировали разное время. Захват ^{45}Ca останавливали внесением в среду инкубации 0,3 мл раствора, содержащего 30 мМ этиленгликоль-бис (β -аминоэтилэфир)N,N-тетрауксусной кислоты (ЭГТА) на 120 мМ NaCl pH 7,4, и 4 мл охлажденного раствора, содержащего 132 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,2 мМ CaCl_2 (раствор 1). Пробы центрифугировали 5 мин при 11 000 g и 4°C. Осадок дважды отмывали охлажденным раствором 1 и подвергали гидролизу в 1 н. NaOH (0,7 мл) при 60°C в течение 30 мин. Гидролизат нейтрализовали 1 мл 0,67 н. HCl. Захват ^{45}Ca определяли при смешивании 1 мл гидролизата с 10 мл сцинтилляционного раствора (нафталин — 50 г, 2,5-дифенилоксазол — 6 г, 1,4-ди-5-фенил-2-оксазол-бензол — 0,5 г, диоксан — до 1 л) в жидкостном сцинтилляционном счетчике фирмы «Packard». Степень захвата оценивали по количеству импульсов в 1 мин на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение

При введении амизила через 10 мин отмечены тенденции к увеличению содержания ионов Ca^{2+} в синапсоме (табл. 1) и снижение концентрации ионов Mg^{2+} . Через 1 ч концентрация Ca^{2+} повышалась в $1\frac{1}{2}$ раза и не-

Таблица 1

Содержание ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} (в мэкв на 1 г влажной ткани) в синапсоме головного мозга крыс при введении арсеколина и амизила

Препарат	Условия эксперимента	Mg^{2+}		Ca^{2+}	
		10 мин	60 мин	10 мин	60 мин
Арсеколин	Контроль	0,45±0,04 (6)	0,48±0,05 (8)	0,32±0,03 (7)	0,41±0,02 (4)
	Опыт	0,6±0,02 (6)	0,52±0,04 (6)	0,26±0,02 (7)	0,46±0,05 (4)
	P	<0,05	>0,5	<0,1	<0,5
Амизил	Контроль	0,41±0,01 (6)	0,35±0,03 (6)	0,5±0,006 (6)	0,45±0,03 (6)
	Опыт	0,33±0,02 (6)	0,40±0,03 (6)	0,55±0,025 (6)	0,67±0,05 (6)
	P	<0,05	>0,3	>0,1	<0,05

Примечание. Здесь и в табл. 3 в скобках — число исследований.

сколько (статистически незначимо) увеличивалось содержание Mg^{2+} . Коэффициент отношения концентраций ионов $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ в эти периоды снижался с 0,82 в контроле до 0,60 в опыте, а через 10 и 60 мин — соответственно с 0,78 до 0,60, что свидетельствует о преобладании в нервных окончаниях ионов Ca^{2+} .

Арсеколин вызывал противоположные изменения. Через 10 мин отмечены статистически значимое увеличение концентрации ионов Mg^{2+} в синапсоме и тенденция к снижению уровня Ca^{2+} . Коэффициент отношения концентрации при этом возрастал с 1,41 до 2,31, что указывает на преоб-

ладание в нервных окончаниях ионов Mg^{2+} . К 1-му часу содержание электролитов превышало контроль, но коэффициент отношения ионов практически не изменялся (1,17 в контроле и 1,13 в опыте), что указывает на сохранение соотношения ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} в синапсосамах, которое характерно для контрольных животных.

В опытах с ^{45}Ca изучено влияние амизила и ареколина на включение изотопа в нервные окончания головного мозга.

Т а б л и ц а 2

Включение ^{45}Ca (в имп/мин на 1 мг белка) в синапсосы головного мозга крыс при введении ареколина и амизила ($n=6$)

Препарат	Условия эксперимента	Время после введения препарата	
		10 мин	60 мин
Ареколин	Контроль	98,2±5,2	54,2±4,1
	Опыт	67,1±1,5	46,0±2,1
	<i>P</i>	<0,05	>0,1
Амизил	Контроль	93,2±5,4	51,1±4,8
	Опыт	103,8±7,0	70,9±4,3
	<i>P</i>	>0,25	<0,05

внутриклеточного перераспределения ионов, так и усиленного поступления их из внеклеточного пространства. Ареколин, наоборот, препятствует включению Ca^{2+} и увеличивает содержание Mg^{2+} .

Т а б л и ц а 3

Активность (в мкг P_H на 1 мг белка за 30 мин) Mg^{2+} - и Ca^{2+} -зависимых АТФ-аз синапсосов головного мозга крыс при введении ареколина и амизила

Препарат	Условия эксперимента	Mg^{2+} -АТФ-аза		Ca^{2+} -АТФ-аза	
		10 мин	60 мин	10 мин	60 мин
Ареколин	Контроль	25,1±1,9 (8)	16,3±1,3 (4)	29,6±2,4 (7)	18,8±1,7 (4)
	Опыт	31,5±2,2 (7)	19,8±0,9 (4)	26,0±1,6 (7)	21,4±1,8 (4)
	<i>P</i>	<0,05	>0,05	<0,25	>0,3
Амизил	Контроль	23,5±1,8 (8)	22,8±1,68 (5)	21,1±1,2 (6)	14,0±1,2 (5)
	Опыт	19,0±0,9 (8)	24,0±1,3 (5)	23,6±1,4 (6)	19,9±1,1 (5)
	<i>P</i>	<0,05	>0,5	<0,2	<0,05

При введении амизила активность Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы синапсосом через 10 мин снижалась (табл. 3), а активность Ca^{2+} -АТФ-азы повышалась, причем более значительно через 1 ч после введения препарата. Ареколин первоначально вызывал активацию Mg^{2+} -АТФ-азы и некоторое снижение активности Ca^{2+} -АТФ-азы. Через 1 ч активность Ca^{2+} -зависимого фермента превышала контроль, но не активность Mg^{2+} -АТФ-азы. Сравнение приведенных данных с изменениями содержания ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} в нервных окончаниях дает возможность утверждать, что изменение активности ферментов при введении амизила и ареколина связано с перераспределением электролитов. Так, снижение коэффициента отношения ионов при действии амизила через 10 мин, указывающее на увеличение содержания ионов Ca^{2+} в синапсосамах, по времени совпадает с активацией Ca^{2+} -АТФ-азы и торможением активности Mg^{2+} -зависимого фермента. Эта зави-

симость сохраняется и через 1 ч после введения препарата. Зависимость активности Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимых АТФ-аз от концентрации электролитов подтверждают также результаты опытов с ареколином.

В опытах *in vitro* была предпринята попытка установить, за счет активации каких процессов амизил и ареколин влияют на поведение ионов Ca^{2+} в пресинаптических образованиях. Было установлено, что при действии амизила захват ^{45}Ca в первые 45 с снижался, а в дальнейшем значительно увеличивался и возвращался к контрольному уровню через 4 мин (рис. 1). Ареколин, напротив, повышал захват изотопа в течение 45 с и практически не изменял его в последующий период наблюдения. В опытах с изучением влияния амизила на захват изотопа на фоне предварительной инкубации синапсом с ареколином установлено, что амизил

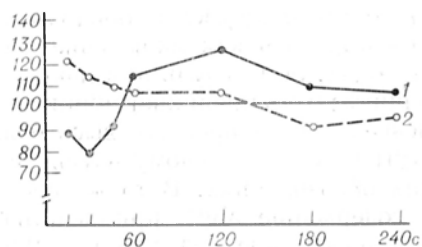


Рис. 1. Действие амизила (1) и ареколина (2) на захват ^{45}Ca синапсосомы.

Здесь и на рис. 2 и 3 по оси абсцисс — время инкубации синапсом с изотопом (рис. 1 и 3) или с амизилом (рис. 2), по оси ординат — захват ^{45}Ca в % от контроля; за 100% принят захват изотопа без добавления веществ (рис. 1 и 2) или деполяризованными синапсосомы (рис. 3).

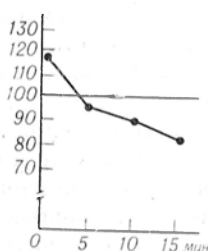


Рис. 2. Снижение захвата ^{45}Ca амизилом на фоне предварительной инкубации синапсом с ареколином.

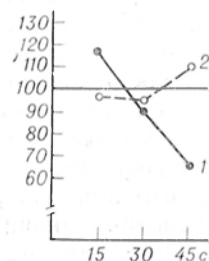


Рис. 3. Действие амизила (1) и ареколина (2) на захват ^{45}Ca предварительно деполяризованными синапсосомы.

подавлял действие ареколина на этот процесс (рис. 2). Полученные результаты показывают, что амизил и ареколин увеличивают захват ^{45}Ca *in vitro*, однако во времени эти процессы существенно различаются, что, по-видимому, обусловлено влиянием амизила и ареколина преимущественно на различные участки мембран пресинаптических образований нейрона, в результате чего проявляется специфичность их действия на процессы включения ионов Ca^{2+} в эти структуры.

В настоящее время предполагают, что ионы Ca^{2+} могут проходить мембраны через быстро активируемые каналы раннего тока, т. е. Na , K -каналы [15], а также через каналы отставленного тока или собственно кальциевые каналы [16]. В связи с этим приведенные данные можно трактовать как активацию Na , K -каналов при введении ареколина и их ингибирование с последующей активацией собственно кальциевых каналов при действии амизила. Результаты опытов с синапсосомы, деполяризованными внесением в среду инкубации избытка ионов K^{+} (конечная концентрация 69 мМ), в определенной мере указывают на то, что под влиянием амизила нарушается быстрый захват Ca^{2+} (рис. 3). Это подтверждает предположение об угнетении каналов раннего тока амизилом. Ареколин практически не оказывал действия на этот процесс при такой постановке опытов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при введении амизила и ареколина изменения, происходящие на мембранах пресинаптических образований, затрагивают процессы транспорта электролитов и влияют на активность ферментов, связанных с этими мембранами. Как установлено, амизил способствует накоплению в нервных окончаниях Ca^{2+} в 1-й час после введения за счет как перераспределения электролитов, так и значительного поступления их из внеклеточного пространства. При этом, как показано в опытах *in vitro*, повышение содержания Ca^{2+} , вероятно, проис-

ходит в результате активации каналов отставленного тока. Эти данные согласуются с выводами Катца и соавт. [17], что в процесс высвобождения нейромедиаторов вовлекаются только те ионы Ca^{2+} , которые проникают в тканевые депо через каналы отставленного тока. Ионы Ca^{2+} , накапливаясь в пресинаптических образованиях, включаются в различные процессы. Как отмечено выше, при этом повышается активность Са-АТФ-азы синапсомембранных мембран, что, вероятно, может привести к конформационным изменениям в мембране и изменению свойств синаптопор. Кроме того, Ca^{2+} снижает заряд поверхности везикул, в результате чего происходит более быстрое слияние последних с пресинаптическими мембранами в процессе экзоцитоза [18], и действует на комплексы, хранящие медиаторы, способствуя их распаду [19].

Хотя в опытах *in vitro* показано, что и ареколин способен повышать захват ^{45}Ca синапсосомами, в условиях *in vivo* этот эффект не обнаружен. Напротив, при введении холиномиметика снижались как включение изотопа, так и концентрация ионов в синапсосомах. Эти результаты дают основание предположить, что в условиях организма путь проникновения ионов Ca^{2+} через быстро активируемые каналы менее значим в процессе высвобождения нейромедиаторов, так как не приводит к существенному изменению концентрации кальция в пресинаптических образованиях. В то же время в последних значительно увеличивается содержание Mg^{2+} при действии ареколина; это позволяет заключить, что повышение содержания Mg^{2+} способствует удержанию ацетилхолина в тканевых депо и сохранению стабильности комплексов, хранящих медиаторы.

Идентичность действия амизила на холин- и адренергические хранилища медиаторов дает возможность предположить, что высвобождающее ацетилхолин и норадреналин действие холинолитика весьма сходно и обусловлено, вероятно, одним и тем же механизмом. Это предположение в некоторой степени подтверждается вполне вероятным сходством в строении комплексов, хранящих ацетилхолин и норадреналин [20, 21], а также кальцийзависимым высвобождением медиаторов из хранилищ в процессе прохождения нервного импульса [1, 2]. Можно также допустить, что системы ферментов, входящие в пресинаптические мембраны холин- и норадренергических синапсов, идентичны или весьма близки по биохимической природе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Visi E. S. — In: Cholinergic Mechanisms. New York, 1975, p. 199—211.
2. Blaszkowski T. P., Bogdanski D. F. — Biochem. Pharmacol., 1971, v. 20, p. 3281—3285.
3. Широкий В. Ф. Проблема качества химического раздражения. Волгоград, 1950.
4. Abood L. G. — In: Psychotomimetic Drugs. New York, 1970, p. 67—80.
5. Барышников И. И. — Труды Воен.-мед. акад. им. С. М. Кирова, 1970, т. 190, с. 138—140.
6. Бандман А. Л., Смирнова Л. В., Софронов Г. А. — Бюлл. экспер. биол., 1973, № 7, с. 56—59.
7. Крылов С. С., Снегирев Е. А. — Там же, 1970, № 9, с. 49—52.
8. Елаев Н. Р., Каррыева М. О., Подосиновикова М. П. — Фармакол. и токсикол., 1972, № 5, с. 632—637.
9. Tischer H., Oelssner W. — Acta biol. med. germ., 1967, Bd 18, S. 443—445.
10. White T. — J. Neurochem., 1975, v. 24, p. 1037—1042.
11. Whittaker V. P. — Progr. Biophys. molec. Biol., 1965, v. 15, p. 39—96.
12. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—268.
13. Valcana T., Timiras P. — J. Neurochem., 1969, v. 16, p. 935—943.
14. Sohn R. S., Ferrendelli Y. A. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1973, v. 185, p. 272—275.
15. Godfraind T. — In: Pharmacology and the Future of Man. San Francisco, 1972, v. 4, p. 344—358.
16. Baker P. F., Hodgkin A. L., Ridgway E. B. — J. Physiol. (Lond.), 1971, v. 218, p. 709—755.
17. Katz B., Miledi R. — J. Physiol. (Lond.), 1969, v. 203, p. 459—487.
18. Matthews E., Nordmann J. — Molec. Pharmacol., 1976, v. 12, p. 778—788.

19. *Pliescher A., Berneis K., De Prada M.* — *Experientia* (Basel), 1971, v. 27, p. 1117—1119.
20. *Rajan K., Davis I., Colburn R.* — *J. Neurochem.*, 1971, v. 18, p. 345—364.
21. *Smythies J., Antum F., Jank G. et al.* — *Nature*, 1971, v. 231, p. 185—188.

Поступила 29/XI 1978 г.

PARTICIPATION OF Mg^{2+} AND Ca^{2+} AND OF CORRESPONDING ATPASES IN PRESYNAPTIC EFFECT OF AMISYLE AND ARECOLINE

E. V. Semenov, S. S. Krylov

Institute of Toxicology, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

Amisyle and arecoline were found to be antagonistic drugs in the effect on content of Mg^{2+} and Ca^{2+} and on activity of corresponding ATPases in synaptosomes isolated from rat brain. Amisyle promoted the incorporation of ^{45}Ca into synaptosomes but arecoline inhibited the reaction. The drugs appear to be responsible for liberation and maintaining of neurotransmitters in presynaptic stores.

УДК 577.152.321

Ю. Е. Вельтищев, Л. В. Калайджиева

СВОЙСТВА ЛИЗОСОМАЛЬНОЙ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ГАНГЛИОЗИДОВ GM_1

Московский научно-исследовательский институт педиатрии и детской хирургии Министерства здравоохранения РСФСР

β -Галактозидаза (КФ.3.2.1.23) является лизосомной гидролазой, которая участвует в расщеплении различных галактоконъюгатов организма: гликолипидов (ганглиозид GM_1 и асиало- GM_1), содержащихся преимущественно в нервной ткани [1, 2], кератансульфатоподобных гликозамингликанов (ГАГ), содержащихся в соединительной ткани [3, 4], гликопротеинов с углеводными латеральными цепями, находящихся в эритроцитной строме [5, 6].

Активность β -галактозидазы определяется при использовании 3H -меченных естественных субстратов [7, 8], а также синтетических субстратов, в частности флюорогена 4-метилумбелиферил- β -D-галактопиранозид (4-МУ-галактопиранозид) [9, 10]. Применение синтетических субстратов стало возможным благодаря исследованиям, показавшим, что один и тот же каталитический центр фермента участвует в гидролизе как ганглиозида GM_1 , так и 4-МУ-галактопиранозид [11].

Свойства β -галактозидазы изучены главным образом в печени. β -Галактозидаза печени человека представляет собой многокомпонентную систему, включающую несколько молекулярных форм энзимов с разными свойствами.

Следуя широко принятой в литературе классификации [7], которая подразделяет молекулярные формы β -галактозидазы на β -галактозидазы А, В и С (или нейтральная β -галактозидаза), их характеристики можно обобщить следующим образом (см. рисунок).

Формы А и В — это первая и вторая фракции фермента, получаемые при гель-фильтрации на сефадексе G-150. Эти фракции отличаются определенными свойствами. Обе имеют кислый оптимум pH (β -галактозидаза А — 4,35, β -галактозидаза В — 4,2). Активность обоих изоферментов зависит от присутствия ионов хлора в инкубационной среде. Влияние ионов хлора состоит в стимуляции и стабилизации фермента [12, 13]. Обе формы термолабильны: инкубация при 37°C в отсутствие ионов хлора приводит к быстрой потере активности. Они активны только по отношению к арил- β -галактозидным связям и отщепляют галактозу от 4-МУ конъюгата, а также от ганглиозида GM_1 [7, 8, 14]. Константы Михаэлиса в отношении 4-МУ-

костной системы не являются патогномоничными для этого заболевания, подобные изменения имеются при мукополисахаридозе I и II типа (при муколипидозе II типа и т. д.). В терминальном периоде развиваются слепота, глухота, децеребрационная ригидность. Смерть наступает обычно на 2-м году жизни, часто вследствие бронхопневмонии.

В центральной нервной системе и внутренних органах обнаруживается накопление ганглиозида GM_1 , который по своему составу и строению идентичен нормальному [3, 29], кроме того, накапливается асиалоганглиозид GM_1 [30]. Накопление этих веществ в нейронах вызывает дегенеративные изменения нервной системы, хотя точные биохимические механизмы, приводящие к этому повреждению, еще не выяснены. В тканях внутренних органов увеличено содержание гликопротеидов и кератансульфатоподобных ГАГ, которые являются причиной висцерального гистиоцитоза и изменения костной системы [5, 31].

II тип (ювенильный). Клиническая симптоматика: психомоторное развитие ребенка нормальное на протяжении первого года жизни. Первыми признаками болезни являются локомоторная атаксия, потеря координации, затруднения речи. В процессе заболевания неврологическая симптоматика быстро прогрессирует. Постепенно развиваются спастические параличи конечностей, которые завершаются спастической квадриплегией. В возрасте 1½ лет появляется судорожный синдром, а после 2-летнего возраста у больных наступает состояние декортикации. Со стороны глаз изменений нет, гепатоспленомегалия также отсутствует. Часты бронхопневмонии. Изменения костной системы минимальны. Смерть наступает между 3 и 10 годом жизни [22, 32, 33].

Ганглиозид GM_1 накапливается в мозге в количестве, близком к наблюдаемому при I типе ганглиозидозов [34, 35], но в печени и селезенке его содержание не увеличено. ГАГ, накапливающиеся в тканях, подобны кератансульфату, как и при I типе.

Кроме случаев, которые легко отнести к I или II типу заболевания, встречаются такие, к которым общепринятая классификация неприменима [36—38]. Так, описаны заболевания [39—41], которые по своим проявлениям со стороны нервной системы, глаз и печени соответствовали I типу — генерализованному ганглиозидозу. Однако отсутствие характерных изменений лица и костной системы сближало их с ганглиозидозом GM_1 II типа.

III тип ганглиозидоза GM_1 . В 1974 г. описан необычный вариант ганглиозидоза GM_1 [42], который в последующем упоминается в литературе как III тип. Ребенок развивался нормально до 5-месячного возраста, когда начались судороги; при клиническом обследовании обнаружены незначительная гепатоспленомегалия и вакуолизация лимфоцитов. Позднее судороги не отмечались, гепатоспленомегалия исчезла, ребенок начал ходить и говорить. После 3-летнего возраста появились изменения со стороны костной системы, что и составляет главную особенность этого типа.

IV тип ганглиозидоза GM_1 (взрослый тип). Проявления β -галактозидазной недостаточности, наблюдаемые у взрослых, отличаются значительными вариациями фенотипа.

Неврологические симптомы, гипотония, атаксия, миоклонус, генерализованные судороги, вишнево-красные пятна в области макулы и рахитоподобные изменения костей наблюдались у больных с установленным дефектом β -галактозидазы [43—46]. Однако, возможно, снижение активности β -галактозидазы, обнаруженное у некоторых из этих больных, являлось вторичным и в действительности больные страдали муколипидозом I типа, связанным с недостаточностью нейраминидазы. Даже если у больных был первичный дефект β -галактозидазы, локализованный в некоторых тканях, его клиническая симптоматика практически неотличима от муколипидоза I типа. Это требует обязательного определения активности кислой нейраминидазы в тканях больных, у которых предполагается IV тип ганглиозидоза GM_1 .

тон, оптимум рН около 6,0. При кислом значении рН активность фермента тормозится ионами хлора. Нейтральная β -галактозидаза расщепляет как β -галактозидные, так и β -глюкозидные связи [12, 13]. Она не активна по отношению к естественным субстратам кислых β -галактозидаз — ганглиозиду ГМ₁ и асиалофетуину [7, 8]. Нейтральная β -галактозидаза не абсорбируется конканавалином А, и таким образом ее можно легко отделить от кислых β -галактозидаз методами афинной хроматографии [16]. Моноспецифическая антисыворотка против β -галактозидазы А не преципитирует нейтральную β -галактозидазу. Таким образом, она отличается по структуре от низкомолекулярной кислой β -галактозидазы А и, вероятнее всего, находится под контролем особого генного локуса [11]. Многие авторы отметили, что активность нейтральной β -галактозидазы в норме подвержена значительным колебаниям, а при патологии часто отсутствует [18, 19].

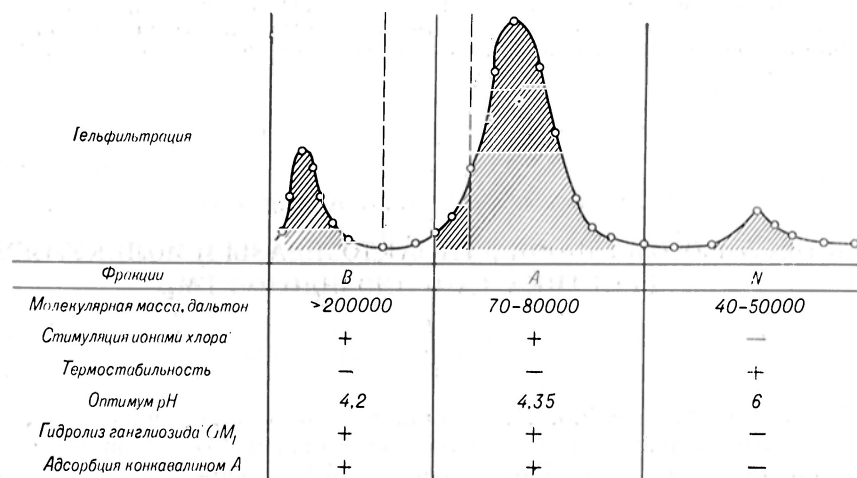
Имея в виду множество естественных субстратов β -галактозидазы, можно объяснить плейотропный эффект мутации гена, кодирующего синтез фермента. Мутация, сопровождающаяся изменением кинетических свойств β -галактозидазы, может привести к накоплению в организме множества веществ — ганглиозидов ГМ₁, гликозаминогликанов, гликопротеинов. Поражение нервной системы, наблюдаемое при ганглиозидозах ГМ₁, является результатом накопления ганглиозидов, а накопление гликопротеинов и ГАГ приводит к поражению внутренних органов и остеохондродистрофии.

Первоначально ганглиозидозы ГМ₁ разделяли на 2 типа в зависимости от клинических особенностей, таких, как возраст к моменту появления первых симптомов и смерти, выраженность висцеральных изменений, наличие остеохондродистрофии и т. д. [20—23]. Новые описания ганглиозидоза ГМ₁ все больше стирают границы между отдельными типами [14]. Вероятно, в большинстве случаев болезнь обусловлена неоднородными генными мутациями с разными фенотипическими проявлениями. Они могут привести к различным изменениям молекулы фермента, т. е. к появлению ферментов с разными каталитическими свойствами [19]. Мутантные энзимы могут характеризоваться приблизительно одинаковой остаточной активностью в отношении естественных субстратов (как ганглиозидов, так и ГАГ) или остаточная активность к одним субстратам может в несколько раз превышать активность к другим, что может быть связано с физико-химическими различиями естественных субстратов, касающихся молекулярной массы, электрического заряда, растворимости и природы галактозидной связи, т. е. свойств, имеющих отношение к стерическим взаимодействиям между субстратом и ферментом. Возможное число мутаций молекул β -галактозидаз, которое может привести к развитию патологических состояний, очень велико, поэтому пока трудно представить исчерпывающую классификацию всех вариантов заболеваний, связанных с недостаточностью β -галактозидазы. В самом обобщенном виде приводится характеристика ГМ₁ ганглиозидозов, важная с точки зрения клинического диагноза, прогноза и генетического консультирования.

1 тип (инфантильный, генерализованный ганглиозидоз ГМ₁). До 1972 г. описано 25 случаев, которые систематизировал О'Брайэн [22]. Клиническая симптоматика: ребенок отстает в физическом и психическом развитии с момента рождения. В периоде новорожденного отмечаются генерализованная гипотония, отеки лица и конечностей, лицевая дисморфия. В процессе дальнейшего роста становится выраженным психомоторное отставание. Наблюдаются нарушение координации движений, повышенные сухожильные рефлексy, клонико-тонические судороги. Со стороны глаз отмечаются страбизм, нистагм и вишнево-красное пятно в области соска зрительного нерва (у 50% больных). Со стороны внутренних органов — гепатоспленомегалия, наблюдающаяся в возрасте старше 6 мес. Характерны частые и тяжело протекающие пневмонии [24—27]. Изменения со стороны

галактопиранозида составляют $2,5 \cdot 10^{-4}$ М для β -галактозидазы А и $2,3 \cdot 10^{-4}$ М для β -галактозидазы В [13], по данным других авторов [15], соответственно $3,5 \cdot 10^{-4}$ и $1,6 \cdot 10^{-4}$ М.

Исследования структуры энзимов показали, что β -галактозидаза А существует в печени человека в форме мономерного гликопротеида с молекулярной массой около 70 000 дальтон [11]. Этот гликопротеид содержит около 10% углеводов, в основном галактозу, сиаловую кислоту, маннозу и N-ацетилглюкозамин. Содержание в этом ферменте маннозы позволяет проводить его очистку путем афинной хроматографии на конканавалине А [16, 17]. Получение очищенного фермента позволило изготовить антисыворотку, вследствие чего стало возможным изучение взаимоотношения изо-



Характеристика лизосомальных β -галактозидаз.

ферментов β -галактозидазы в тканях и нарушения синтеза белка при наследственных дефектах фермента [11].

β -Галактозидаза В представляет собой форму фермента, отличающуюся большой молекулярной массой — более 200 000 дальтон и, как уже упоминалось, с кинетическими свойствами, близкими к свойствам β -галактозидазы А. Вопрос о взаимосвязи структур высоко- и низкомолекулярной кислой β -галактозидазы еще не решен. Здесь следует упомянуть результаты исследований [18], согласно которым соотношения между этими фракциями меняются при изменении ионной силы буфера, используемого для элюции белка, т. е. речь может идти о солезависимой агрегации молекул фермента. Не вызывает сомнений факт, что высоко- и низкомолекулярные формы β -галактозидазы структурно сходны между собой. На это указывают их общие свойства, а также тот факт, что антисыворотка к низкомолекулярной фракции фермента преципитирует также и высокомолекулярную фракцию [11]. Это означает, что обе формы содержат общий полипептид, а их синтез находится (полностью или частично) под общим генетическим контролем. Обе формы представляют собой сиалогликопротеины и связываются с конканавалином А [16]. При соответствующих условиях низкомолекулярную форму можно получить из высокомолекулярной под влиянием воздействий, разрушающих липидно-белковые связи [18]. Некоторые авторы [19] считают, что высокомолекулярная форма является агрегатом низкомолекулярной β -галактозидазы. Возможно также, что высокомолекулярная фракция представляет собой комплекс низкомолекулярной β -галактозидазы с фрагментами лизосомальных мембран [18].

Нейтральная β -галактозидаза С значительно отличается по своим свойствам от кислых β -галактозидаз. Ее молекулярная масса около 50 000 даль-

Сузуки [47], обобщая свои наблюдения и данные литературы, выделяет 3 группы β -галактозидазной недостаточности взрослого типа: 1) прогрессирующая атаксия, миоклонус, мукополисахаридозоподобные изменения лица и костей и вишнево-красное пятно на глазном дне; 2) аналогичные неврологические симптомы, но без изменения лица и глазного дна; 3) прогрессирующая пирамидная и экстрапирамидная симптоматика и генерализованная атрофия мускулатуры. Последний симптомокомплекс является самым патогномоничным для IV типа β -галактозидазного дефекта.

Имеются экспериментальные данные, указывающие, что мутация фермента при ганглиозидозах GM_1 является точечной структурной мутацией. Исследование печени больных с I и II типами [19, 40], а также 3 больных со взрослым типом β -галактозидазного дефекта [48] с применением антисыворотки к β -галактозидазе выявило присутствие нормальных или близких к нормальным количеств иммунореагирующего белка-фермента. Таким образом, во всех случаях речь шла об иммунореагирующих мутантах (или +ИРМ). Применение техники тканевой гибридизации [49—51] между фибробластами больного с данным типом ганглиозидоза GM_1 и больных с I и II типами привело к комплементации и восстановлению активности β -галактозидазы. Комплементацию двух структурных мутантов можно объяснить, видимо, тем, что структурные изменения белковых молекул привели к изменениям третичной структуры фермента, что неблагоприятно отражается на его каталитических функциях. Эти изменения корректируются в смешанном гетерополимере благодаря соответствующим взаимодействиям между двумя мутантными мономерами.

В отличие от ганглиозидозов GM_2 , при которых клинические варианты болезни Тея — Сакса обусловлены дефектом определенного изофермента гексозаминидазы, патогенез и биохимические основы ганглиозидозов GM_1 далеко не так ясны. Пока не найдено строгой корреляции между клиническими и биохимическими данными, особенно при I и II типах. Остаточная активность β -галактозидазы у больных с ганглиозидом GM_1 I типа составляет 0,06—0,41 нормы при применении в качестве субстрата 4-МУ-галактопиранозида [19]. Активность энзима при II типе [19] приблизительно того же порядка, хотя отмечается известная тенденция к более высоким показателям. У больных с взрослым типом остаточная активность фермента, определенная в культивированных фибробластах, составляла около 10% нормы [48].

Первоначально предполагалось, что при ганглиозидозе GM_1 I типа отсутствует активность всех изоэнзимов β -галактозидазы (как кислых, так и нейтральных), тогда как при II типе активность нейтральной β -галактозидазы сохранена [22]. В новейшей литературе можно встретить описания случаев с повышением активности нейтральной β -галактозидазы, при отсутствии или резком снижении активности кислых галактозидаз [23, 39]. Некоторые авторы выделяют 3 типа ганглиозидоза GM_1 независимо от клинических проявлений: с отсутствием активности нейтральной β -галактозидазы, с нормальной активностью и с повышением активности этого фермента [39] при отсутствии кислых галактозидаз. С другой стороны, кислая и нейтральная β -галактозидаза различаются по иммунохимическим свойствам, что указывает на существование отдельного генетического контроля синтеза этих ферментов. Так как трудно объяснить, каким образом единственный генетический дефект может привести к одновременному отсутствию активности двух ферментов, О'Брайэн [19] предполагает, что мутация затрагивает только один локус кислой β -галактозидазы А. Очень низкую или отсутствующую активность нейтральной галактозидазы этот автор объясняет большими «физиологическими» вариациями активности этого фермента. По мнению других авторов [40], снижение активности нейтральной β -галактозидазы является результатом ингибирования фермента избыточным количеством мукополисахаридов, накапливающихся в тканях. Что касается соотношения между двумя кислыми β -галактозидазами (высоко-

и низкомолекулярной), то большинство авторов считают, что обе эти фракции неактивны при ганглиозидозе ГМ₁. Наряду с другими данными о сходстве характеристик кислых β-галактозидаз это дает основание полагать [19], что две формы близки по структуре и функциям. Пока не установлено, содержит ли высокомолекулярная форма полипептид, отличающийся от общего для низко- и высокомолекулярной форм фермента. Если такой полипептид на самом деле существует, его структурная мутация объяснила бы феномен комплементации, отмеченный при гибридизации фибробластов I и IV типа ганглиозидоза ГМ₁ [48].

Во всяком случае, в патогенезе ганглиозидозов ГМ₁ еще много неясного и лишь дальнейшие исследования позволят получить ответ на многие вопросы.

ЛИТЕРАТУРА

- Gatt S. — Biochim. biophys. Acta, 1967, v. 137, p. 192.
- Hajra A., Bowen D., Kishimoto Y. et al. — J. Lipid Res., 1966, v. 7, p. 379.
- Suzuki K. — Science, 1968, v. 159, 1471.
- Tsay G., Dawson G. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1973, v. 52, p. 759.
- Wolfe L., Senior R., Ng-Ying-Kin N. M. — J. biol. Chem., 1974, v. 249, p. 1828.
- Brunngraber E., Berra B., Zambotti V. — FEBS Letters, 1973, v. 34, p. 350.
- Norden A., O'Brien J. — Arch. Biochem., 1973, v. 159, p. 383.
- Ho M., Cheetham P., Robinson D. — Biochem. J., 1973, v. 136, p. 351.
- Robinson D. — Comp. Biochem. Physiol., 1964, v. 12, p. 95.
- Hultberg B., Öckerman P. — Clin. chim. Acta, 1972, v. 39, p. 49.
- Norden A., Tennant L., O'Brien J. — J. biol. Chem., 1974, v. 249, p. 7969.
- Ho M., O'Brien J. — Clin. chim. Acta, 1970, v. 30, p. 531.
- Ho M., O'Brien J. — Ibid., 1971, v. 32, p. 443.
- Suzuki Y., Suzuki K. — J. biol. Chem., 1974, v. 249, p. 2097.
- Hultberg B., Öckerman P. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1969, v. 23, p. 213.
- Norden A., O'Brien J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1974, v. 56, p. 193.
- Miller A., Frost R., O'Brien J. — Analyt. Biochem., 1976, v. 74, p. 537.
- Cheetham P., Dance N. — Biochem. J., 1976, v. 157, p. 189.
- O'Brien J. — Clin. Genet., 1975, v. 8, p. 303.
- O'Brien J. — Lancet, 1969, v. 2, p. 805.
- O'Brien J., Ho M., Veath M. et al. — Clin. Genet., 1972, v. 3, p. 411.
- O'Brien J. — In: The Metabolic Basis of Inherited Disease. Ed. J. Stanbury, J. Wyngaarden, D. Fredrickson, New York, 1972, p. 639.
- Singer H., Schafer J. — Am. J. hum. Genet., 1972, v. 24, p. 454.
- Landing B., Silverman F., Craig J. et al. — Am. J. Dis. Child., 1964, v. 108, p. 503.
- O'Brien J. — J. Pediat., 1969, v. 75, p. 167.
- Sacrez R., Juif J., Gigonnet J. et al. — Pédiatrie, 1967, v. 22, p. 143.
- Scott C., Lagunoff D., Trump B. — J. Pediat., 1967, v. 71, p. 357.
- McKusick V. — Heritable Disorders of Connective Tissue, St. Louis, 1966, p. 325.
- Gonatas N., Gonatas J. — J. Neuropath. exp. Neurol., 1965, v. 24, p. 318.
- Suzuki K., Chen G. — J. Lipid Res., 1967, v. 8, p. 105.
- Suzuki K., Suzuki K., Chen G. — J. Neuropath. exp. Neurol., 1968, v. 27, p. 15.
- Derry D., Fawcett J., Andermann F. et al. — Neurology (Minneap.), 1968, v. 18, p. 340.
- Kint J., Dacremont G., Wlielink R. — Lancet, 1969, v. 2, p. 108.
- Suzuki K., Suzuki K., Kamoshita S. — J. Neuropath. exp. Neurol., 1969, v. 28, p. 25.
- Wolfe L., Callahan J., Fawcett J. et al. — Neurology (Minneap.), 1970, v. 20, p. 23.
- Suzuki Y., Crocker A., Suzuki K. — Arch. Neurol. (Chic.), 1971, v. 24, p. 58.
- Feldges A., Mueller H., Buehler E. et al. — Helv. paediat. Acta, 1973, v. 28, p. 511.
- Taori G., Basu D., Chandi S. et al. — J. neurol. Sci., 1974, v. 21, p. 77.
- Suzuki Y., Hayakawa T., Yazaki M. et al. — Europ. J. Pediat., 1976, v. 122, p. 177.
- Meisler M., Rattazzi M. — Am. J. hum. Genet., 1974, v. 26, p. 683.
- Orii T., Sukegawa K., Kudoh T. et al. — Tohoku J. exp. Med., 1975, v. 117, p. 197.
- Pinsky L., Miller J., Schanfield B. et al. — Am. J. hum. Genet., 1974, v. 26, p. 563.
- O'Brien J., Gugler E., Giedion A. et al. — Clin. Genet., 1976, v. 9, p. 495.
- Goldeberg M., Cotlier E., Fichenscher L. et al. — Arch. intern. Med., 1971, v. 128, p. 387.
- Orii T., Minami R., Sukegawa K. et al. — Tohoku J. exp. Med., 1972, v. 107, p. 303.

46. Yamamoto A., Adochi S., Kamamura S. et al. — Arch. intern. Med., 1974, v. 134, p. 627.
47. Suzuki Y. — Clin. chim. Acta, 1977, v. 75, p. 91.
48. O'Brien J., Norden A. — Am. J. hum. Genet., 1977, v. 29, p. 184.
49. Galjaard H., Hoogeveen A., Keijzer W. et al. — Nature, 1975, v. 257, p. 60.
50. Galjaard H., Hoogeveen A., Keijzer W. et al. — Exp. Cell. Res., 1974, v. 87, p. 444.
51. Thomas G., Taylor H., Miller C. et al. — Nature, 1974, v. 250, p. 580.

Поступила 4/XII 1978 г.

PROPERTIES OF LYSOSOMAL β -GALACTOSIDASE AND MOLECULAR GENETICS OF GANGLIOSIDES GM₁

Yu. E. Vel'tischev, L. V. Kalayjieva

Institute of Pediatrics and Child Surgery, Ministry of Public Health of the RSFSR,
Moscow

Review of the data is presented on the hereditary disease gangliosidosis GM₁ and on the enzyme β -galactosidase, deficiency of which is responsible for this disease. Heterogeneity of the disease and existence of various forms of β -galactosidase are considered. Possible correlation is discussed between the defects of the enzyme forms detected and the type of the disease.

УДК 616.36-099-085.28-07:616.153.1-074

В. В. Иванов, Д. А. Грищенко, Л. Г. Климацкая

ФЕРМЕНТЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ОЦЕНКЕ ХАРАКТЕРА ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ АКРИЛОНИТРИЛОМ

Красноярский медицинский институт

Значительный рост производства синтетических материалов на основе акрилонитрила вызывает необходимость разработки методов ранней диагностики и профилактики профессиональных заболеваний, вызванных этим промышленным ядом. Имеющиеся данные свидетельствуют о выраженном токсическом действии акрилонитрила, однако характер поражения печени при отравлении этим ядом остается неясным [1, 2].

Для выяснения биохимических нарушений, характеризующих тип поражения печени при отравлениях акрилонитрилом и разработки методов ранней диагностики, а также изыскания методов химиотерапевтических вмешательств с целью устранения выявленных нарушений исследовали характер и последовательность изменений активности комплекса ферментов сыворотки крови: фруктозомонофосфата альдолазы (ФМФА; КФ 4.2.1.7), отсутствующей в крови в норме и обнаруживаемой лишь при остром некротическом поражении печени [3, 4]; бутирилхолинэстеразы (БХЭ; КФ 3.1.1.8), синтезируемой печенью, ее активность снижается при нарушении белковосинтезирующей функции печени [5, 6]; щелочной фосфатазы (ЩФ; КФ 3.1.3.1), повышение уровня которой свидетельствует о нарушении процессов желчеобразования и оттока желчи в желчных путях [7]. Ранее было показано [8], что указанные ферменты позволяют дифференцировать различные типы поражения печени, возникающие под влиянием ряда гепатотоксических ядов.

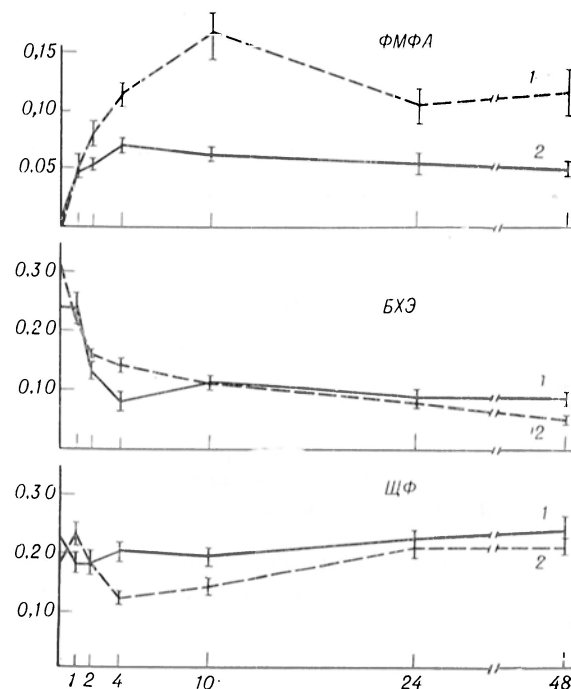
Методика

Работа выполнена на белых беспородных крысах обоего пола массой 150—250 г. В каждой серии использовали 8—14 животных. Акрилонитрил вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг. Для защиты низко- и высокомолекулярных тиолов за 30 мин до акрилонитрила вводили внутрибрюшинно 25 или 400 мг/кг L-цистеина (рН раство-

ра — до 7,4) или 120 мг/кг восстановленного глутатиона. В опытах по изучению протекторного действия антиоксидантов вводили внутримышечно α -токоферол ацетат (100 мг/кг) трехкратно за 48, 24 и 2 ч до инъекции акрилонитрила или 30 мг/кг ионола (4-метил-2,6-ди-третбутилфенол) внутривенно за 6 ч до введения акрилонитрила. В части опытов изучали влияние фенobarбитала (100 мг/кг), вводимого внутривенно 1 раз в день в течение 3 сут до введения акрилонитрила. У всех животных до начала опыта и через 1, 2, 4, 10, 24 и 48 ч после инъекции акрилонитрила из хвостовой вены брали кровь, в сыворотке определяли активность ФМФА [9], БХЭ [10] и ЩФ [11], которую выражали в мкмоль/мин гидролизованного субстрата на 1 мл сыворотки крови за 1 мин при 37°C. Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с использованием критерия Стьюдента [12].

Результаты и обсуждение

В наших опытах фоновая активность ФМФА составляла 0—0,01 мкмоль/мин·мл⁻¹. Как видно из рисунка, после введения акрилонитрила активность фермента возрастает, максимум отмечается через 4—10 ч



Влияние отравления акрилонитрилом на активность ФМФА, БХЭ и ЩФ в сыворотке крови. По оси абсцисс — время (в ч); по оси ординат — активность ферментов (в мкмоль/мин·мл⁻¹). 1 — акрилонитрил; 2 — акрилонитрил на фоне предварительного введения фенobarбитала.

(590—520% от фона; $P < 0,01$). Высокая активность ФМФА сохраняется на протяжении всего периода исследования. Иная динамика активности отмечается для БХЭ в крови тех же животных. При отравлении акрилонитрилом она снижается на 50—60% и в период от 4 до 48 ч после введения яда остается на уровне 0,08—0,11 мкмоль/мин·мл⁻¹ ($P < 0,02$). Инкубация сыворотки крови с 1 мМ акрилонитрилом в течение 30 мин при 37°C не сопровождается изменением активности БХЭ, что свидетельствует против прямого влияния яда на молекулу фермента, однако не исключает возможного действия продуктов метаболизма акрилонитрила. Активность ЩФ существенно не изменялась на протяжении всего опыта и составляла 0,18—0,22 мкмоль/мин·мл⁻¹.

В опытах с предварительным введением фенobarбитала (см. рисунок, 2), усиливающего токсический

эффект ядов, действие которых обусловлено их метаболизмом [13], отмечается возрастание активности ФМФА, намного превышающее таковое у животных, получавших только акрилонитрил. Скорость реакции достигала 0,17 мкмоль/мин·мл⁻¹, что составляет 1960% от фона ($P < 0,01$), и оставалась значительно повышенной через 48 ч. Активность БХЭ в сыворотке крови животных этой серии была также снижена, однако дополнительного нарастания эффекта акрилонитрила не отмечалось. Изменения активности ЩФ, как и в опытах с введением одного акрилонитрила, были недостоверны.

В опытах с затравкой акрилонитрилом на фоне предварительного введения цистеина или глутатиона были получены следующие результаты.

Цистеин в дозе, эквимоларной количеству введенного яда (25 мг/кг), предупреждал на протяжении всего эксперимента появление в сыворотке крови ФМФА, но не снижение активности БХЭ (в таблице приведены данные через 4 ч после введения яда). Снижение активности БХЭ при введении акрилонитрила оказалось возможным предотвратить лишь значительно более высокой дозой цистеина. Следует отметить, что глутатион защищал БХЭ в значительно меньшей дозе (см. таблицу). Вероятно, это связано с тем, что цистеин в живой клетке используется во многих метаболических процессах и лишь часть его включается в восстановленный глутатион [14], который и оказывает протекторное действие.

Ранее [15] нами было показано, что акрилонитрил индуцирует перекисное окисление липидов при добавлении к постмитохондриальной надосадочной фракции печени крыс. В связи с этим в другой серии экспериментов изучали возможное защитное действие природного (токоферол) и синтетического (ионол) антиоксидантов. Предварительное введение токоферола полностью предупреждало появление в крови ФМФА и снижение активности БХЭ при отравлении акрилонитрилом (см. таблицу). Ионол, вызывающий в используемых дозах нарастание антиокислительной активности тканей [16], также оказывал защитное действие. Сами антиоксиданты в наших опытах не изменяли активности ФМФА и БХЭ.

Суммируя полученные данные, можно сказать, что отравление акрилонитрилом вызывает некроз гепатоцитов, о чем свидетельствует появление в крови ФМФА и нарушение белковосинтезирующей функции печени с развитием в ней дистрофических изменений, что подтверждается снижением активности БХЭ. В литературе описаны характерные для некроза морфологические изменения печени и снижение уровня альбуминов [17], фибриногена крови [18] при отравлении акрилонитрилом. В наших экспериментах акрилонитрил, очевидно, не вызывал поражения желчных путей, на что указывает отсутствие изменений активности ЩФ, количество которой резко нарастает в крови при воспалительных или застойных процессах в желчных путях [7].

Динамика изменений активности ФМФА хорошо отражает степень поражения печени при отравлении акрилонитрилом и введении различных протекторов. Менее показательны в этом случае данные об активности БХЭ. Отчетливый защитный эффект тиоловых соединений полностью согласуется с данными о том, что предварительное введение цистеина приводит к удвоению периода выживания мышей [18], а также к предотвращению гибели крыс при заведомо смертельных дозах акрилонитрила [19]. Эти данные указывают на важную роль связывания эндогенных тиолов в механизме токсического действия акрилонитрила.

Известно, что сульфгидрильные группы тиолов клеточного сока играют роль антиоксидантов [20]. Вероятно, их связывание при введении столь реакционноспособного яда, как акрилонитрил, может приводить к сниже-

Влияние предварительного введения тиоловых соединений и антиоксидантов на гепатотоксичность акрилонитрила

Вводимое соединение	Изменение активности ферментов относительно исходных величин			
	ФМФА		БХЭ	
	абс.	%	абс.	%
Акрилонитрил	$+0,07 \pm 0,01^*$	+590	$-0,16 \pm 0,05^*$	-67
Цистеин: 25 мг/кг	$+0,01 \pm 0,01$	0	$-0,13 \pm 0,01^*$	-65
400 мг/кг	—	—	$-0,01 \pm 0,01$	-15
Глутатион	$+0,02 \pm 0,03$	+3	$-0,04 \pm 0,02$	-18
Токоферол	0	—	$-0,04 \pm 0,01$	-18
Ионол	$+0,02 \pm 0,01$	+11	$-0,05 \pm 0,03$	-28

Примечание. Фоновая активность ферментов, определяемая в сыворотке крови крыс до начала опыта, составляла для ФМФА и БХЭ соответственно $0-0,01$ и $0,19-0,22$ мкмоль/мл сыровотки при 37°C . Затем животным вводили химиотерапевтические препараты и через 4 ч после инъекции акрилонитрила брали кровь. Приведены средние величины по данным 6-14 опытов. Звездочкой показана достоверность различий с исходными величинами.

нию антиокислительной активности тканей и в результате к нарастанию скорости перекисного окисления липидов и накоплению продуктов этих превращений, вызывающих нарушение проницаемости мембран и повреждение ферментов биосинтеза белка [20], а это может быть причиной гепатотоксичности акрилонитрила. Увеличение под влиянием акрилонитрила количества малонового диальдегида в печени крыс [15] и выраженное протекторное действие токоферола и ионола, обнаруженное в настоящей работе, являются серьезными аргументами в пользу этого предположения и делают перспективным поиск протекторов отравляющего действия этого промышленного яда серии антиоксидантов.

Считаем своим приятным долгом выразить искреннюю признательность проф. А. И. Арчакову за обсуждение материалов настоящей работы и канд. биол. наук В. Е. Кагану, любезно предоставившему ионол для наших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Grahl R.* — *Zbl. Arbeitsmed.*, 1972, Bd 20, S. 369.
2. *Gut I., Kopecky I., Nerudova I. et al.* — *Prakov. Lek.*, 1976, v. 56, p. 110.
3. *Покровский А. А., Арчаков А. И., Герасимов А. М. и др.* — *Бюлл. exper. биол.*, 1968, № 5, с. 60.
4. *Kaldor J.* — *Clin. chim. Acta*, 1970, v. 28, p. 145.
5. *Покровский А. А.* — *Вопр. мед. химии*, 1960, № 6, с. 228.
6. *Jorge A. D., Sancher D.* — *Acta hepato-Gastroent. (Stuttg.)*, 1976, Bd 23, S. 19.
7. *Kaplan M.* — *Clin. Res.*, 1968, v. 16, p. 530.
8. *Блиндер Л. В., Гаспарян С. А., Малюгин Э. Ф. и др.* — *Бюлл. exper. биол.*, 1973, № 5, с. 24.
9. *Брагинский Д. М., Пакторис И. А., Синайко Г. А.* — В кн.: *Совещание по клинической биохимии инфекционных болезней. 2-е. Материалы.* Рига, 1963, с. 134.
10. *Vincent D., Segonsac G.* — *Ann. Biol. clin.*, 1958, v. 16, p. 227.
11. *Bessey O., Lowry O., Brock M.* — *J. biol. Chem.*, 1946, v. 164, p. 321.
12. *Бейли Н.* *Статистические методы в биологии.* М., 1962.
13. *Арчаков А. И.* *Микросомальное окисление.* М., 1975.
14. *Reed D. J., Orrenius S.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 77, p. 1257.
15. *Иванов В. В., Кузнецова Г. П., Арчаков А. И.* — *Вопр. мед. химии*, 1978, т. 24, с. 818.
16. *Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте.* Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. М., 1975.
17. *Соловей Л. И.* *Влияние интоксикации альфаметилстиролом и нитрилом акриловой кислоты на показатели белкового, липидного и углеводного обменов и пути терапевтического воздействия.* Автореф. дис. докт. Новосибирск, 1973.
18. *Szabo S., Boor P., Oldwang M. et al.* — In: *International Congress of Toxicology Abstracts.* Toronto, 1977, p. 9.
19. *Бондарев Г. И., Стасенкова К. П., Виссарионова В. Я.* — *Вопр. питания*, 1976, № 4, с. 55.
20. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.* М., 1972.

Поступила 4/XII 1978 г.

THE ENZYMES OF BLOOD SERUM IN IMPAIRMENT OF LIVER TISSUE BY ACRYLONITRILE AND EFFICIENCY OF CHEMOTHERAPEUTIC TREATMENT

V. V. Ivanov, D. A. Grischenko, L. G. Klimatskaya

State Medical School, Krasnoyarsk

After intraperitoneal administration of acrylonitrile into rats, fructose monophosphate aldolase was found in blood serum, activity of butyryl cholinesterase was inhibited but activity of alkaline phosphatase was unaltered in rat blood serum; these data demonstrate the necro-bystrophic type of liver impairment. Decrease in the hepatotoxic effect of acrylonitrile after preadministration of antioxidants appears to be a result of stimulation of lipid peroxidation, preventing the toxic effect of this industrially important substance.

А. Т. Пикулев, А. И. Щербань

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ Na, K-АТФ-АЗЫ МОЗГА КРЫС
НОРАДРЕНАЛИНОМ

Кафедра биохимии Белорусского университета им. В. И. Ленина, Минск

В последнее время все больше внимания уделяется проблеме регуляции активности Na, K-АТФ-азы (КФ 3.6.1.3) в нервной системе биогенными аминами, выполняющими роль нейромедиаторов. Это обусловлено тем, что данная ферментная система играет важную роль в механизме синаптической передачи [1]. Предполагается, что биогенные амины (норадреналин, дофамин, 5-окситриптамиин) могут осуществлять регуляцию активности Na, K-АТФ-азы мембран нервной ткани путем удаления эндогенных ингибиторов фермента (возможно, Ca^{++}) [2, 3], либо, как показано для норадреналина, через адренорецепторы [4, 5]. Однако вопрос о механизмах, посредством которых биогенные амины оказывают воздействие на Na, K-АТФ-азную систему, еще далек от полного разрешения [3].

Целью данной работы было исследование возможности реализации эффектов норадреналина на Na, K-АТФ-азу через адренергическую систему рецепции.

Методика

Опыты были поставлены на белых крысах-самцах массой 150—200 г, содержавшихся на стандартном рационе вивария. Из серого вещества полушарий головного мозга выделяли фракцию тяжелых микросом по методу [6]. Микросомы суспендировали в 0,32 М сахарозе и хранили при -20°C .

Активность Na, K-АТФ-азы определяли как разность между общей и Mg-зависимой АТФ-азой. Общую АТФ-азную активность измеряли по накоплению неорганического фосфата [7] в течение 10 мин в среде следующего состава в миллимолях: MgCl_2 — 3, АТФ — 3, NaCl — 130, KCl — 20, имидазол-HCl — 30, pH 7,4 (37°C). Среда для определения активности Mg-АТФ-азы не содержала ионов Na^{+} (последние эквивалентно замещались ионами K^{+}) [8]. Концентрация белка в пробах (конечный объем 1 мл) составляла 10 мкг. Перед началом реакции ферментный препарат преинкубировали с изучаемыми веществами в среде инкубации в течение 10 мин (37°C). Реакцию начинали добавлением АТФ. Условия проведения реакции соответствовали линейным участкам зависимости активности фермента от концентрации белка и времени инкубации. В применяемых концентрациях исследуемые вещества не влияли на метод определения неорганического фосфата. Концентрацию белка в микросомальной фракции определяли с использованием красителя амидо черного 10 Б по методу [9].

Результаты исследования обработаны статистически с использованием критерия t по Стьюденту [10]. Активность Na, K-АТФ-азы и Mg-АТФ-азы, определяемая в стандартной среде инкубации без добавления изучаемых веществ, принята за 100%. Контрольная активность Na, K-АТФ-азы составляла в среднем $16,4 \text{ мкмоль } P_n \text{ на } 1 \text{ мг белка в час}$, Mg-АТФ-азы — $18,3 \text{ мкмоль } P_n \text{ на } 1 \text{ мг белка в час}$.

В работе использовали имидазол, АТФ, 5'-АМФ фирмы «Reanal» (Венгрия), 3',5'-АМФ (цАМФ) — фирмы «Sigma» (США), пропранолол гидрохлорид — фирмы «Isis-chemie» (ГДР), а также норадреналин гидротартрат, фенилэфрин гидрохлорид, фентоламин гидрохлорид, теofilлин отечественного производства. Динатриевую соль АТФ, перекристаллизованную по методу Бергера [11], переводили в имидазольную форму на колонке с Дауэкс-50 (H^{+} -форма) [8].

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, А эффект норадреналина на Na, K-АТФ-азу тяжелой микросомальной фракции зависит от дозы. Так, в концентрациях $5 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ и $5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ норадреналин незначительно увеличивает активность фермента, в концентрации $5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ наблюдается максимальная активация Na, K-АТФ-азы (28%, $P < 0,001$). При увеличении концентрации выше $5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ эффект норадреналина изменяется на противоположный и при концентрации $1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ активность Na, K-АТФ-азы ингибируется на 42%

($P < 0,001$). В отличие от Na, К-АТФ-азы Mg-АТФ-аза нечувствительна к норадреналину в широком диапазоне концентраций ($5 \cdot 10^{-7}$ М— $5 \cdot 10^{-4}$ М), и лишь высокие концентрации норадреналина ($1 \cdot 10^{-3}$ М) достоверно увеличивают активность Mg-АТФ-азы (табл. 1). Таким образом, норадреналин *in vitro* оказывает двухфазное действие на Na, К-АТФ-азу, причем эффекты малых и больших концентраций носят разнонаправленный характер. Полученные данные хорошо согласуются с результатами работы [12], в которой

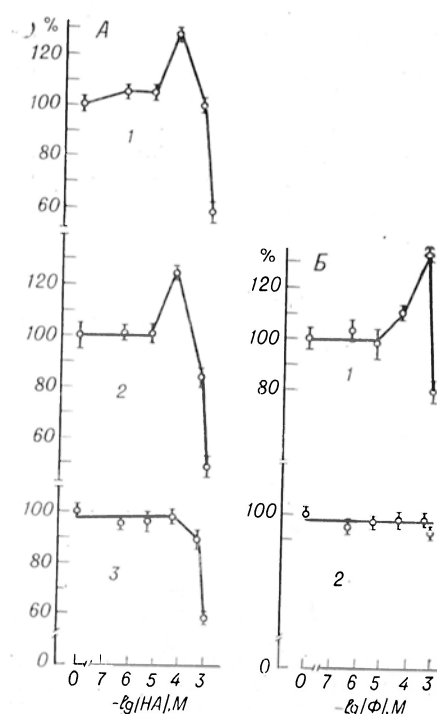


Рис. 1. Зависимость активности Na, К-АТФ-азы тяжелых микросом мозга крыс от концентрации норадреналина (А) или фенилэфрина (Б). А: 1 — контроль; 2 — при добавлении пропранолола ($1 \cdot 10^{-5}$ М); 3 — при добавлении фенотолamina ($1 \cdot 10^{-5}$ М). Б: 1 — контроль; 2 — при добавлении фенотолamina ($1 \cdot 10^{-5}$ М). Каждая точка представляет собой среднюю величину ($M \pm m$) из результатов 5 опытов.

рующее действие этого амина (см. рис. 1, А). При этом сами адреполитики ($1 \cdot 10^{-5}$ М) не оказывали влияния на АТФ-азную активность. Как пропранолол, так и фенотоламин не изменял качественной стороны эффекта норадреналина на Mg-АТФ-азу, наблюдалось лишь увеличение активирующего действия высоких концентраций норадреналина (см. табл. 1). Необходимо отметить, что, в отличие от эффекта малых концентраций ($5 \cdot 10^{-5}$ М) на Na, К-АТФ-азу, эффект больших концентраций норадреналина ($1 \cdot 10^{-3}$ М) не снимался ни пропранололом, ни фенотолamiном. Таким образом, представленные результаты дают основание предполагать, что в условиях *in vitro* активирующий эффект норадреналина на Na, К-АТФ-азу тяжелых микросом серого вещества полушарий головного мозга крыс опосредуется через α -адренергические рецепторы. Возможность регуляции активности Na, К-АТФ-азы через α -адренергические рецепторы подтверждается также данными, полученными при изучении действия селективного агониста α -ад-

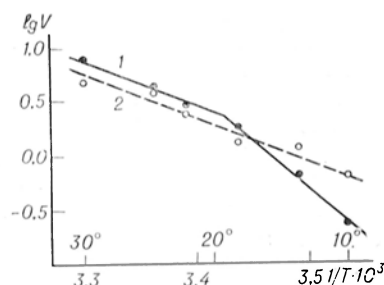


Рис. 2. Влияние норадреналина на температурную зависимость Na, К-АТФ-азы тяжелых микросом мозга крыс.

1 — контроль (кажущаяся энергия активации ниже 19°C — $40,3$ ккал/моль, выше 19°C — $19,2$ ккал/моль); 2 — при добавлении норадреналина ($5 \cdot 10^{-5}$ М) (кажущаяся энергия активации $19,2$ ккал/моль).

также было показано различие эффектов больших и малых концентраций норадреналина на Na, К-АТФ-азу головного мозга крыс.

В дальнейшем мы исследовали возможность реализации эффектов норадреналина на Na, К-АТФ-азу через адренергические рецепторы. В связи с этим было изучено действие этого препарата на фоне блокады α - и β -адренорецепторов. β -Адренолитик пропранолол в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М не изменял эффекта норадреналина на Na, К-АТФ-азу (см. рис. 1, А). В то же время α -адренолитик фенотоламин ($1 \cdot 10^{-5}$ М) полностью снимал активи-

К ст. В. В. Алатырцева и др.

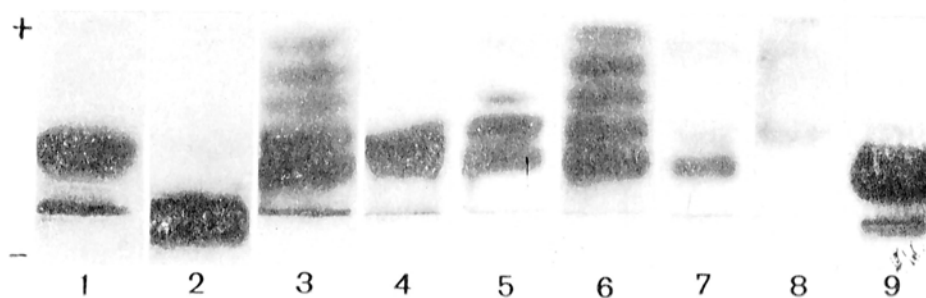


Рис. 1. Изоферменты альдолазы в тканях человека и крысы (электрофорез на крахмальном геле).

1—3 — крыса: 1 — сердце, 2 — печень, 3 — головной мозг, 4—9 — человек: 4 — печень, 5 — сердце, 6 — головной мозг, 7 — эритроциты новорожденного, 8 — эритроциты новорожденного (специфическая окраска), 9 — скелетная мышца.

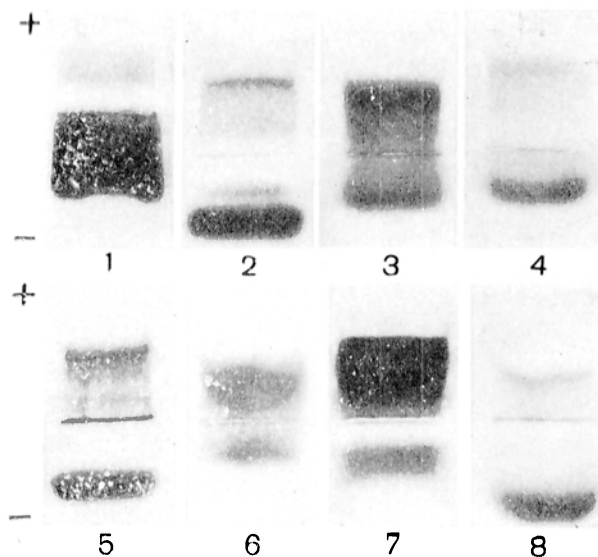


Рис. 2. Изоферменты альдолазы в тканях человека и крысы (электрофорез на агаровом геле).

1—6 — человек: 1 — головной мозг, 2 — печень, 3 — эритроциты новорожденного, 4 — эритроциты взрослого, 5 — корковый слой почки, 6 — скелетная мышца; 7 и 8 — крыса: 7 — сердце, 8 — печень.

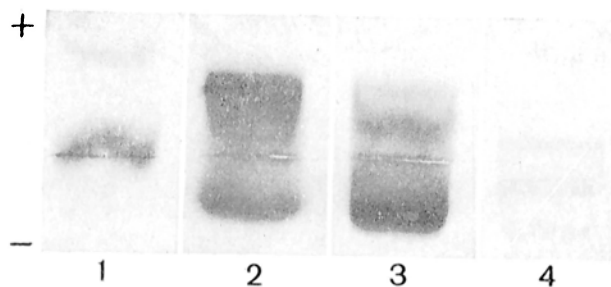


Рис. 3

Рис. 3. Молекулярные разновидности альдолазы скелетной мышцы кролика, гемолизата и оболочек эритроцитов человека (электрофорез на агаровом геле).

1 — альдолаза скелетной мышцы кролика; 2 — гемолизат; 3 — оболочки эритроцитов; 4 — оболочки эритроцитов (неспецифическая окраска).

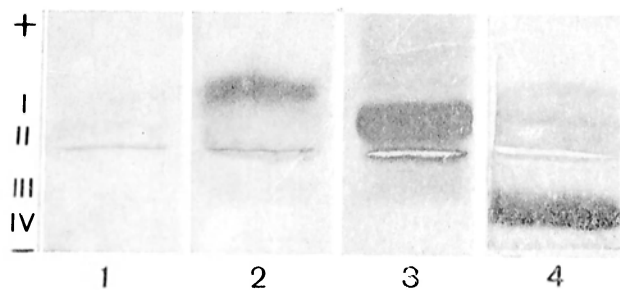
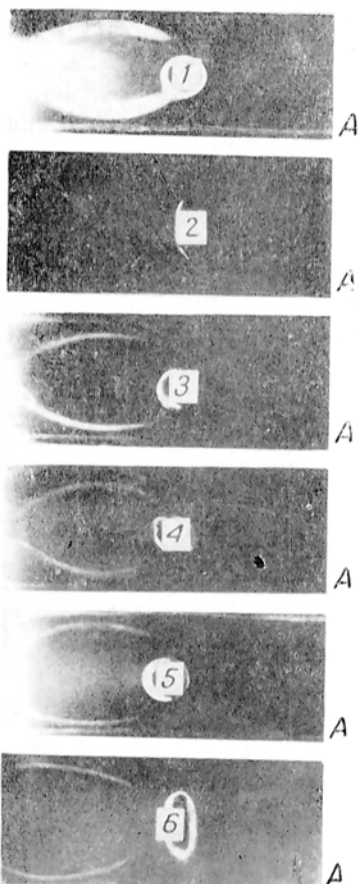


Рис. 4

Рис. 4. Изоферменты альдолазы в сыворотке крови.

1 — норма; 2 — новорожденный ребенок; 3 — больной инфарктом миокарда; 4 — больной вирусным гепатитом. I—IV — фракции альдолазы.



К ст. Д. Н. Фалалеева и др.

Иммунорадиоавтографический анализ ЛФГ в культуральной жидкости эмбриональных органов человека.

А — моноспецифическая антисыворотка к ЛФГ. 1 — печень; 2 — печень (контроль); 3 — желудочно-кишечный тракт; 4 — почка; 5 — легкие; 6 — кости.

ренергических рецепторов фенилэфрина. Как и в случае с норадреналином, фенилэфрин вызывает увеличение активности Na, К-АТФ-азы (32%, $P < 0,01$), которое полностью снимается фентоламином ($1 \cdot 10^{-5}$ М (см. рис. 1, Б). На активность Mg-АТФ-азы фенилэфрин влияния не оказывает (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Изменение Mg-АТФ-азной активности (в%) тяжелых микросом мозга крыс при действии адреномиметиков раздельно и совместно с адренолитиками

Концентрация адреномиметика, М	Норадреналин	Норадреналин + пропранолол ($1 \cdot 10^{-5}$ М)	Норадреналин + фентоламин ($1 \cdot 10^{-5}$ М)	Фенилэфрин	Фенилэфрин + фентоламин ($1 \cdot 10^{-5}$ М)
$5 \cdot 10^{-7}$	93,1 ± 5,1	97,6 ± 3	98,1 ± 2,9	96,9 ± 2,2	101 ± 1,9
$5 \cdot 10^{-6}$	98,2 ± 5,1	102 ± 2,4	103 ± 6,8	98,2 ± 1,4	100 ± 1,3
$5 \cdot 10^{-5}$	97,7 ± 4,4	106 ± 2,2	115 ± 3,1*	95,9 ± 1,5	99,8 ± 1
$5 \cdot 10^{-4}$	112 ± 6,5	131 ± 9*	142 ± 1,8*	96,4 ± 1,8	98,7 ± 1,4
$1 \cdot 10^{-3}$	136 ± 9,2*	165 ± 8,1*	191 ± 5,6*	96,3 ± 1,5	99,7 ± 1,1

* Изменения достоверны ($P < 0,05$).

Примечание. Здесь и в табл. 2—3 приведены средние значения активностей ($M \pm m$) из результатов 5 опытов.

Согласно представлениям Грингарда [13], регуляция активности Na, К-АТФ-азы нейромедиаторами осуществляется через цАМФ-зависимые процессы. Известно также, что в коре головного мозга крыс норадреналин

Т а б л и ц а 2

Влияние цАМФ и 5'-АМФ на Na, К-АТФ-азную и Mg-АТФ-азную активность (%) тяжелых микросом мозга крыс

Концентрация эффектора, М	цАМФ		цАМФ + теofilлин ($1 \cdot 10^{-2}$ М)		5'-АМФ	
	Na, К-АТФ-аза	Mg-АТФ-аза	Na, К-АТФ-аза	Mg-АТФ-аза	Na, К-АТФ-аза	Mg-АТФ-аза
$1 \cdot 10^{-7}$	76,7 ± 4,1*	89,1 ± 9,9	87 ± 8,3	93,2 ± 6,7	94,1 ± 2,5	106,1 ± 8,7
$1 \cdot 10^{-6}$	85,9 ± 6,7*	85,5 ± 8,2	77,9 ± 7*	88,5 ± 8,8	104,8 ± 9,3	72,6 ± 6,1
$1 \cdot 10^{-5}$	74,4 ± 7,4*	86,4 ± 5,9	73,1 ± 5*	95,7 ± 8,7	97,4 ± 3,6	91,1 ± 5,3
$1 \cdot 10^{-4}$	70 ± 5,7*	99,4 ± 2,5	64,7 ± 3,9*	89,6 ± 2,6	96,7 ± 2,6	88,8 ± 10
$1 \cdot 10^{-3}$	69,1 ± 3,4*	91,9 ± 11,9	—	—	94,4 ± 0,4	79,9 ± 5,6

* Изменения достоверны ($P < 0,05$).

может вызывать образование цАМФ через активацию как α -, так и β -адренергических рецепторов [14]. В связи с этим мы исследовали возможность опосредования эффектов норадреналина на Na, К-АТФ-азу через цАМФ. Данные, представленные в табл. 2, показывают, что в концентрациях от $1 \cdot 10^{-7}$ М до $1 \cdot 10^{-3}$ М цАМФ достоверно снижает активность Na, К-АТФ-азы, при этом достоверных изменений активности Mg-АТФ-азы не наблюдается. Добавление в среду инкубации теofilлина ($1 \cdot 10^{-2}$ М) не изменяло эффект цАМФ. 5'-АМФ не влияет на активность АТФ-аз. Таким образом, полученные результаты не подтверждают участия цАМФ в рецепторной активации Na, К-АТФ-азы. Можно предположить, что цАМФ участвует в ингибирующем эффекте норадреналина. В этом случае в присутствии цАМФ следовало бы ожидать увеличения ингибиции активности Na, К-АТФ-азы, вызывае-

мой порадреналином. Однако в эксперименте этого не наблюдается (табл. 3), что, по-видимому, отрицает участие цАМФ в эффекте высоких концентраций порадреналина.

Одним из предполагаемых путей реализации действия порадреналина на Na, К-АТФ-азу может быть генерализованная структурная перестройка в системе адренорецептор — мембрана — мембранносвязанная Na, К-АТФ-аза [15]. По-видимому, косвенно в пользу

Таблица 3

Влияние цАМФ на ингибирующий эффект порадреналина на Na, К-АТФ-азную активность тяжелых микросом мозга крыс

Эффектор	Na, К-АТФ-азная активность, %		P
	—	+ цАМФ ($1 \cdot 10^{-5}$ М)	
Контроль	100 ± 3	73,4 ± 3,5	<0,001
Порадреналин ($1 \cdot 10^{-3}$ М)	48,7 ± 1,8	51,6 ± 3,5	>0,1

данного предположения свидетельствуют результаты, полученные нами при изучении влияния порадреналина на температурную зависимость активности Na, К-АТФ-азы. Как видно из рис. 2, кривая на графике Аррениуса для Na, К-АТФ-азы при отсутствии порадреналина имеет перегиб в области 20°C. При добавлении в среду инкубации порадреналина ($5 \cdot 10^{-5}$ М) график температурной зависимости становится линейным. По-видимому, этот факт можно объяснить тем, что взаимодействие порадреналина с рецептором приводит к изменениям в липидной фазе мембраны, так как известно, что перегиб на графике Аррениуса для Na, К-АТФ-азы обусловлен структурными переходами липидов в мембране [15]. Конечным результатом этой последовательности событий является изменение активности Na, К-АТФ-азы.

Таким образом, результаты, представленные в данной работе, подтверждают возможность регуляции активности Na, К-АТФ-азы мозга крыс порадреналином через α -адренергические рецепторы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глебоз Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов. М., 1978.
2. Godfraind T., Koch M. C., Verbeke N. — Biochem. Pharmacol., 1974, v. 23, p. 3505—3511.
3. Lee S. L., Phillis J. W. — Canad. J. physiol. Pharmacol., 1977, v. 55, p. 961—964.
4. Gilbert J. C., Wyllie M. G., Davison D. V. — Nature, 1975, v. 255, p. 237.
5. Лыскова Т. И., Аксентьев С. Л., Адзерихо Р. Д. и др. — Биофизика, 1977, т. 22, № 3, с. 547—548.
6. Глебов Р. Н., Гришанкова Е. В., Мезенцев А. Н. и др. — Биохимия, 1972, т. 37, № 2, с. 360—364.
7. Rathbun W., Bellach V. — Analyt. Biochem., 1969, v. 28, p. 436—445.
8. Транспортные аденозинтрифосфатазы. М., 1977, с. 173—177.
9. Parov M., Schmitt M., Schulze S. et al. — Acta biol. med. germ., 1975, Bd 34, S. 1441—1446.
10. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973.
11. Berger E. — Biochim. biophys. Acta, 1956, v. 20, p. 23—26.
12. Кометиани З. П., Джариашивили Т. Я. — Изв. АН ГССР, Сер. биол., 1975, т. 1, с. 190—196.
13. Greengard P. — Nature, 1967, v. 260, p. 101—108.
14. Schultz J., Daly J. W. — J. Neurochem., 1973, v. 21, p. 1319—1326.
15. Болдырев А. А., Твердислов В. А. Молекулярная организация и механизм функционирования Na-насоса. М., 1978.

Поступила 6/XII 1978 г.

REGULATION OF Na,K-ATPASE ACTIVITY BY NORADRENALINE IN RAT BRAIN

A. T. Pikulev, A. I. Scherban

Chair of Biochemistry, Byelorussian State University, Minsk

Effect of noradrenaline on activity of Na,K-ATPase from heavy microsomes of rat brain was studied *in vitro*; the effect of noradrenaline was shown to be dose dependent. The maximal activation of the enzyme was observed at $5 \cdot 10^{-5}$ M concentration of the catecholamine; an increase of its concentration above $5 \cdot 10^{-4}$ M inhibited Na,K-ATPase. β -Adrenolytic drug propranolol $/1 \cdot 10^{-5}$ M/ did not affect the noradrenaline action. At the same time, an α -adrenolytic drug phentholamine $/1 \cdot 10^{-5}$ M/ decreased down to zero the activating effect of the catecholamine, but did not affect the inhibitory effect of noradrenaline at high concentrations $/1 \cdot 10^{-3}$ M/. Effects of selective α -adrenomimetic compound phenylephrine were also studied. The data obtained suggest that the activating effect of noradrenaline on Na,K-ATPase from rat brain is mediated through α -adrenoreceptors.

УДК 577.152.412'164

В. В. Алатырцев, А. В. Сирота, Ю. А. Юрков

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ РАЗНОВИДНОСТЕЙ АЛЬДОЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И КРЫСЫ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА НА КРАХМАЛЬНОМ И АГАРОВОМ ГЕЛЯХ

Институт педиатрии АМН СССР, Москва

В организме человека и животных существует альдолаза трех основных типов — А, В и С. Молекулы альдолаз являются тетрамерами и различаются структурой полипептидных субъединиц, синтез которых контролируется различными генами. При произвольной ассоциации субъединиц альдолаз А и С или А и В образуется 5 изоферментов, состоящих соответственно из 2 родительских типов и 3 гибридных форм [1, 2].

Величины отношений активности с фруктозо-1,6-дифосфатом (Ф-1, 6-ДФ) к активности с фруктозо-1-фосфатом (Ф-1-Ф) составляют для альдолазы А приблизительно 50, для В — 1 и для С — 10. Особенности каталитических свойств альдолаз А и В соответствуют характеру их распределения в органах и предполагаемой функции каждой из них в углеводном обмене. Функциональное значение альдолазы С еще неясно [2].

В клинической практике и экспериментальных исследованиях большое распространение получили методы определения активности альдолаз с использованием в качестве субстратов Ф-1, 6-ДФ и Ф-1-Ф [3—5]. Однако эти методы не позволяют достаточно полно дифференцировать изоферменты альдолазы. Большими возможностями в этом отношении обладают методы зонального электрофореза [1, 6, 7]. В то же время следует отметить, что в отличие от изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) электрофоретическая подвижность изоферментов альдолазы существенно варьирует в зависимости от типа носителя и буферной системы. Кроме того, при выявлении изоферментов альдолазы гистохимическим методом [1] часто наблюдается развитие неспецифической окраски, обусловленное изоферментами ЛДГ [8]. Указанные факторы, по-видимому, являются одной из причин разноречивости данных о спектре изоферментов альдолазы в тканях человека [6, 9—12] и крысы [1, 13, 14].

В настоящей работе была поставлена задача дать оценку спектра изоферментов альдолазы тканей человека и крысы с помощью электрофореза на крахмальном и агаровом гелях, а также выяснить возможности применения этих методов для определения изоферментов альдолазы в сыворотке крови в целях диагностики.

Ткани сердца, головного мозга, печени и икроножной мышцы были взяты от трупов двух здоровых взрослых людей в возрасте 20 и 40 лет, погибших при катастрофе, через 12—14 ч после смерти. Исследовали также головной мозг, сердце и печень 8 белых крыс массой 250—300 г. Надосадочную жидкость гомогенатов тканей получали по методике, описанной нами ранее [15]. Эритроциты 15 взрослых людей и детей старшего возраста (7—14 лет), а также 27 новорожденных 1-й недели жизни выделяли из гепаринизированной крови. Эритроциты гемолизировали 0,15% раствором тритона X-100 (1 : 4) или дистиллированной водой (при выделении оболочек эритроцитов). Для осаждения теней гемолизаты центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 30 мин на ЦЛР-1. К оболочкам после их многократной отмывки от гемоглобина 0,25 М раствором сахарозы добавляли 0,5% тритон в количестве 0,3 мл на 0,1 мл эритроцитов. Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования 100 000 g в течение 30 мин, использовали для анализа.

Изоферменты альдолазы разделяли методом вертикального электрофореза на крахмальном геле по Смитису [16]. Гель готовили на 0,076 М трис-цитратном буфере pH 9,0. Электродный буфер состоял из 0,3 М борной кислоты, 1 н. NaOH, pH 9,0. Электрофорез проводили при 4°C в течение 3 1/2 ч, сила тока 35 мА. Нижний пласт геля инкубировали в субстратной смеси [1] с незначительными изменениями ее состава: 0,1 М трис-HCl pH 7,4 — 46 мл, Ф-1, 6-ДФ — 8 мМ, НАД — 1 мМ, арсенит натрия — 5 мМ, ЭДТА — 1 мМ, НСТ — 0,4 мМ, цианистый натрий — 2,5 мМ, глицероальдегидфосфатдегидрогеназа — 0,1 мл суспензии (1 г на 84 мл), ФМС — 2 мг в 2 мл H₂O. Инкубацию проводили при 37°C в течение 2 ч. В целях дифференцировки специфической и неспецифической окраски параллельно проводили инкубацию агаровых пластинок в смеси, не содержащей субстрата. Для количественной оценки спектр изоферментов альдолазы фотографировали при стандартных условиях на фотопленку чувствительностью 65 ед. Интенсивность окраски фракций регистрировали в виде кривых на автоматическом денситометре ИФО-451, после чего рассчитывали соотношения полипептидных субъединиц А и С в спектре изоферментов альдолазы [17].

Активность изоферментов альдолазы определяли также в элюатах из участков крахмального геля. Предварительно устанавливали локализацию изоферментов альдолазы при помощи окрашенных гистохимическим методом параллелей. Кусочки геля, содержащие изоферменты, вырезали и гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора в веронал-мединаловом буфере pH 7,4. Суспензию центрифугировали (100 000 g, 1 ч, 4°C). Надосадочную жидкость использовали для определения активности альдолазы. Таким же способом получали элюаты из агарового геля.

Электрофорез на агаровом геле проводили по методу Ю. А. Юркова и соавт. [18]. Исключение составляли незначительные методические изменения при фракционировании изоферментов альдолазы сыворотки крови больных вирусным гепатитом [19]. Для окраски изоферментов альдолазы после электрофореза агаровые пластинки инкубировали в течение 1 ч 40 мин при 37°C в субстратной смеси указанного выше состава.

Активность альдолазы с использованием в качестве субстрата Ф-1, 6-ДФ и Ф-1-Ф определяли микрометодом по А. А. Покровскому и соавт. [20].

Очищенный препарат альдолазы из скелетных мышц кролика был получен от фирмы «Feraк» (Берлин).

Результаты и обсуждение

Данные, полученные при использовании метода электрофореза на крахмальном геле, показали, что в головном мозге человека содержится 5 изоферментов альдолазы — А₄, А₃С, А₂С₂, АС₃ и С₄ (рис. 1, см. на вклейке). По подвижности от катода к аноду наиболее быстрым являлся изофермент С₄, самым медленным — А₄, гибридные формы изоферментов альдолазы характеризовались промежуточной подвижностью. Содержание альдолазы А (57%) в спектре изоферментов головного мозга (табл. 1) было несколько выше, чем альдолазы С (43%). В сердце человека обнаружено 3 изофермента альдолазы — А₄, А₃С и А₂С₂. Содержание альдолазы А (80%) в спектре изоферментов этого органа существенно превышало содержание альдолазы С. Одна фракция альдолазы, занимающая по своей подвижности промежуточное положение между изоферментами А₄ и А₃С, была обнаружена в печени. Отношение активностей фермента с Ф-1, 6-ДФ и Ф-1-Ф в элюате фракции составляло 1,1. Эта величина близка к коэффициенту отношений активностей с указанными субстратами для альдолазы В [21]. Скелетная мышца человека содержала главным образом изофермент А₄. В эритроцитах у детей старшего возраста и новорожденных

также была обнаружена альдолаза A_4 . Наличие слабоокрашенных фракций, соответствующих по подвижности изоферментам альдолаз A_3C и AC_3 , как выяснилось, было обусловлено неспецифической окраской (см. рис. 1).

В головном мозге крысы выявлено 5 изоферментов альдолазы, которые по подвижности не отличались от изоферментов альдолазы головного мозга человека (см. рис. 1). Наряду с этим в других органах установлены определенные видовые вариации как по распределению изоферментов альдолазы, так и по их электрофоретической подвижности. В отличие от сердца человека, в котором содержатся, кроме альдолазы A_4 , гибридные формы альдолаз $A-C$, в сердце крысы обнаружен только один изофермент A_4 (см. табл. 1).

Две фракции изоферментов альдолазы выявлены в печени крысы. Небольшая анодная фракция соответствовала по подвижности изоферменту A_4 , другая фракция — катодная, как показывает величина отношений активностей альдолазы с Ф-1, 6-ДФ и Ф-1-Ф в элюате, равная 1,2, являлась альдолазой В. Эти данные соответствуют данным литературы, свидетельствующим об отсутствии гибридных форм альдолаз $A-V$ в печени крыс [6]. Отмечаемое разделение альдолазы печени крыс на 5 фракций [14], по-видимому, является следствием гетерогенности альдолазы типа В [22].

При попытке фракционирования изоферментов альдолазы сыворотки крови методом электрофореза на крахмальном геле не удалось получить достаточно воспроизводимых результатов.

На основании сравнения электрофоретической подвижности изоферментов альдолазы на крахмальном и агаровом гелях можно считать, что гибридные формы A_3C , A_2C_2 , AC_3 , а также альдолаза C_4 при электрофорезе на агаровом геле движутся от места старта в направлении анода как одна фракция (рис. 2, см. на вклейке). Другая небольшая фракция альдолазы мозга соответствовала по подвижности катодной фракции альдолазы скелетной мышцы. На энзимореграммах альдолазы скелетных мышц и эритроцитов наблюдались 2 фракции, одна из них мигрировала от места старта к аноду, а другая — к катоду. Электрофоретическое разделение на агаровом геле альдолазы указанных тканей на 2 фракции, выявленные гистохимическим методом, было подтверждено также при определении активности фермента в элюатах (табл. 2), полученных из

Таблица 1

Содержание (в %) изоферментов альдолазы в органах человека и крысы

Объект исследования	Орган	Изоферменты альдолазы					Соотношение субъединиц A_3C
		A_4	A_3C	A_2C_2	AC_3	C_4	
Человек	Головной мозг	28,0	20,4	18,1	18,5	15,0	57,0 : 43,0
	Сердце	43,5	32,4	24,4	—	—	79,7 : 20,3
Крыса	Головной мозг ($n=7$)	$42,2 \pm 1,84$	$22,6 \pm 1,99$	$10,1 \pm 0,59$	$14,1 \pm 1,09$	$11,0 \pm 1,32$	67,8 : 32,2
	Сердце ($n=7$)	100	—	—	—	—	100 : 0

областей локализации этих фракций. В спектре изоферментов печени и коркового слоя почек интенсивно окрашенной являлась катодная фракция, содержащая альдолазу типа В. Эта фракция характеризовалась наиболее быстрой подвижностью в направлении к катоду. Вторая небольшая фракция альдолазы печени, также мигрирующая к катоду, соответствовала по расположению катодной фракции альдолазы скелетной мышцы. Незначительные по интенсивности окраски фракции альдолазы печени и коркового слоя почки отмечались и в области анода.

Т а б л и ц а 2

Соотношение (в %) фракций альдолазы скелетных мышц и эритроцитов, выявленных с помощью двух различных методов

Метод	Скелетная мышца		Эритроциты	
	анодная фракция	катодная фракция	анодная фракция	катодная фракция
Определение активности в элюатах ($n=4$)	40,6 \pm 5,24	59,4 \pm 5,24	32,7 \pm 7,74	67,3 \pm 7,74
Гистохимический способ окраски ($n=5$)	43,4 \pm 1,98	56,6 \pm 1,98	42,0 \pm 2,91	58,0 \pm 2,91

На энзимограмме сердца крысы наблюдались 2 фракции альдолазы (см. рис. 2). Большая часть альдолазы А сердца крысы мигрировала в направлении к аноду. Фракция альдолазы В печени крысы была близка по подвижности к альдолазе В печени человека. Две другие небольшие фракции альдолазы печени крысы соответствовали по подвижности фракциям альдолазы А.

Результаты, полученные при электрофорезе на крахмальном геле, а также данные литературы [7, 9] позволяют считать, что скелетные мышцы, эритроциты человека и сердце крысы содержат главным образом один изофермент — альдолазу A_4 . В то же время при электрофорезе на агаровом геле мы обнаружили разделение альдолазы этих тканей на 2 фракции. В связи с этим заслуживают внимания полученные за последнее десятилетие данные, указывающие на существование микрогетерогенности альдолазы [23—25]. Методом изоэлектрической фокусировки чистые препараты альдолазы А разделены на 5 активных компонентов, состоящих соответственно из 5 разновидностей тетрамеров — α_4 , $\alpha_3\alpha'$, $\alpha_2\alpha_2'$, $\alpha\alpha_3'$, α'_4 [25]. Предполагается, что основой различий между субъединицами является деамидация аспарагинового остатка в субъединице α' [26], которая рассматривается как стадия деградации (старения) молекул фермента [27]. По мнению других авторов [24], субъединицы α и α' могут являться различными аллеломорфными формами одного и того же пептида. Можно допустить, что разделение альдолазы А на две фракции при электрофорезе на агаровом геле служит проявлением своеобразия подвижности микрогетерогенных молекул на этом носителе. Полученное нами разделение очищенной альдолазы А из мышцы кролика на две фракции методом электрофореза на агаровом геле (рис. 3, см. на вклейке) свидетельствует в пользу указанного предположения. Не исключено, что причиной гетерогенности альдолазы А является также взаимодействие части ее молекул с метаболитами или фрагментами субклеточных структур. Так, на представленных энзимофореграммах (см. рис. 3) видно, что оболочки эритроцитов содержат в основном катодную фракцию альдолазы, тогда как в гемолизатах наряду с катодной отмечается высокая активность анодной фракции.

В отличие от эритроцитов взрослых людей в эритроцитах новорожденных мы обнаружили более высокое содержание анодной фракции альдолазы А (табл. 3 и рис. 2). Установленная особенность, возможно, имеет связь с наблюдаемыми различиями по степени ингибирования неорганическим

фосфатом активности альдолазы эритроцитов новорожденных и взрослых людей [28]. Однако для решения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования.

Методом электрофореза на агаровом геле было проведено фракционирование изоферментов альдолазы в сыворотке крови здоровых детей старшего возраста, новорожденных, а также больных вирусным гепатитом и инфарктом миокарда (рис. 4, см. на вклейке). В сыворотке крови здоровых детей обнаружено до 3 фракций альдолазы, которые по электрофоретической подвижности от анода к катоду обозначались как I, II и III. Анализ подвижности этих фракций показал, что фракции I и II содержат альдолазы типа А и С. Определяемая в виде следов фракция III, по-видимому, является альдолазой А. В сыворотке крови новорожденных отмечена высокая активность фракций I и III.

При инфаркте миокарда обнаружено значительное повышение содержания фракций альдолазы II и III. При болезни Боткина появляется дополнительная фракция — IV, которая по подвижности соответствует альдолазе В. Ранее [19] нами было показано, что у детей с заболеваниями печени увеличение содержания этой фракции в сыворотке крови соответствует степеням повышения активности Ф-1-Ф-альдолазы. Полученные данные свидетельствуют о том, что определение изоферментов альдолазы в сыворотке крови с помощью метода электрофореза на агаровом геле можно использовать для диагностики заболеваний печени, а также инфаркта миокарда.

Т а б л и ц а 3
Содержание (в %) фракций альдолазы А эритроцитов новорожденных и взрослых

Объект исследования	Фракция альдолазы		Общая активность, мкмоль на 1 мл эритроцитов в 1 мин
	анодная	катодная	
Новорожденные (n=15)	53,3±2,46	46,7±2,46	1,41±0,066
Взрослые (n=13)	28,4±2,88	71,6±3,38	0,72±0,067

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Penhoet E., Rajkumar T., Rutter W. — Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A., 1966, v. 54, p. 1275.
2. Rutter W. J., Rejkumar T., Penhoet E. et al. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1968, v. 151, p. 102.
3. Покровский А. А., Мусин И. И. — Биохимия, 1966, т. 31, с. 1197.
4. Брагинский Д. М., Пакторис Е. А., Синайко Г. А. — Клин. мед., 1965, № 2, с. 99.
5. Karldor J., Schidvone D. J. — Clin. Chem., 1968, v. 14, p. 735.
6. Leberherz H. G., Rutter W. J. — Biochemistry (Wash.), 1969, v. 8, p. 109.
7. Tzvetanova E. — Clin. Chem., 1971, v. 17, p. 926.
8. Falkenberg F., Lehmann F. G., Pfeleiderer G. — Clin. chim. Acta, 1969, v. 23, p. 265.
9. Yeltman D. R., Harris B. J. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 484, p. 188.
10. Tigges F. J. — In: Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes. Stuttgart, 1973, p. 184.
11. Dikow A. L. — Z. klin. Chem., 1969, Bd 7, S. 278.
12. Allen B. L., Gracy R. W., Harris B. G. — Arch. Biochem., 1973, v. 155, p. 325.
13. Луцки Б. Д., Тумов М. Б., Луцки М. Д. и др. — Лабор. дело, 1971, № 1, с. 13.
14. Masters C. J. — Biochim. biophys. Acta, 1968, v. 167, p. 161.
15. Юрков Ю. А., Алатырцев В. В., Дайхин Е. И. — Онтогенез, 1975, т. 6, p. 368.
16. Smithies O. — Biochem. J., 1955, v. 61, p. 629.
17. Clarke F. M., Masters C. J. — Arch. Biochem., 1973, v. 156, p. 673.
18. Юрков Ю. А., Алатырцев В. В., Боковой А. Г. — Педиатрия, 1972, № 7, p. 48.
19. Юрков Ю. А., Алатырцев В. В. — Лабор. дело, 1966, № 12, p. 705.
20. Покровский А. А., Арчаков А. И., Болтунова А. И. и др. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1968, т. 2, с. 54.
21. Eagles P., Iqbal M. — Biochem. J., 1973, v. 133, p. 429.
22. Покровский А. А., Дегтярева Н. С., Коровников К. А. — В кн.: Эволюция функций в онтогенезе. Л., 1972, с. 26.

23. Jkehara Yukio, Yanagi Susumu, Kamiya Tomoya — J. Biochem. (Tokyo), 1972, v. 72, p. 203.
24. Susor W. A., Kochman M., Rutter W. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973, v. 209, p. 328.
25. Gurtler B., Leuthardt F. — Helv. chim. Acta, 1970, v. 53, p. 654.
26. Lai C. L. — Arch. Biochem., 1975, v. 166, p. 358.
27. Horecker B. L. — In: Isozymes. New York, 1975, v. 1, p. 11—13.
28. Gross J., Syllm-Rapoport J., Graubaum H. J. et al. — Dtsch. Gesundh.-Wes., 1976, Bd 31, S. 620.

Поступила 11/XII 1978 г.

CHARACTERISTICS OF MOLECULAR MODIFICATIONS OF HUMAN AND RAT ALDOLASES BY MEANS OF STARCH AND AGAR GEL ELECTROPHORESIS

V. V. Alatyrtsev, A. V. Sirota, Yu. A. Yurkov

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

Content of aldolase isoenzymes was reinvestigated in human and rat tissues by means of agar and starch gel electrophoresis. Heterogeneity of the A type aldolase is established and possible causes of formation of the multiple forms of the enzyme are discussed. The ratio of various fractions of aldolase A was different in erythrocytes of newborn and adult persons. The patterns of the aldolase isozyme spectra were characterized in blood sera of newborns, in acute hepatitis and myocardial infarction.

УДК 615.214.22:547.891.2].015.43:612.351.11

Н. Я. Головенко, Е. И. Орлюк

ВЛИЯНИЕ ТРАНКВИЛИЗАТОРОВ 1,4-БЕНЗДИАЗИПИНОВОГО РЯДА НА АКТИВНОСТЬ ГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА И ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТАЗЫ ГЕПАТОЦИТОВ БЕЛЫХ КРЫС

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

Среди большого числа психотропных средств в последние годы широкое применение получили транквилизаторы — производные 1,4-бенздиазепина. Необходимость длительного применения препаратов 1,4-бенздиазепинового ряда делает актуальной задачей изучение толерантности к транквилизаторам.

В литературе имеются сведения о привыкании лабораторных животных к бенздиазепинам [1—3]. Отмечено, что при длительном введении диазепам и хлордиазеноксида в постепенно увеличивающихся дозах развиваются привыкание к противосудорожному эффекту (тест максимального электрошока), нарушение ориентировочных реакций, тогда как по антикоразоловому действию выраженной толерантности не отмечается. Обнаружена также перекрестная толерантность между диазепамом и хлордиазеноксидом по миорелаксационному эффекту у мышей и крыс.

Исходя из сказанного выше, а также из современных представлений о том, что в основе механизмов толерантности к лекарственным средствам лежит ускорение их метаболизма, связанное с активацией ферментных систем микросом печени, мы изучили способность диазепам, хлордиазеноксида, а также отечественного транквилизатора феназепам воздействовать на некоторые ферменты эндоплазматического ретикулума печени белых крыс.

Методика

Диазепам, хлордиазеноксид и феназепам были синтезированы в нашей лаборатории.

Опыты проводили на крысах-самцах массой 200—250 г. Животные были разделены на 3 группы. Крысам 1-й группы в течение 4 дней внутривенно вводили вещества в дозе 50 мг на 1 кг массы, крысам 2-й — по 100 мг/кг в твиновой эмульсии и 3-й (контрольная группа) — только твиновую эмульсию. Через 24 ч после последней инъекции животных умерщвляли, вскрывали грудную и брюшную полости и пер-

фузировали печень холодным 1,15% KCl до светло-желтого цвета. Печень извлекали, отжимали на марлевой салфетке и гомогенизировали в 1,15% KCl в соотношении 1 : 2. Гомогенат центрифугировали центрифуге ЦРЛ-1 в течение 15 мин при 12 000 g. Микросомы печени получали из постмитохондриальной жидкости, которую центрифугировали в ультрацентрифуге ВЛК-601 в течение 60 мин при 105 000 g.

Концентрацию цитохрома *P*-450 определяли по поглощению комплекса восстановленного цитохрома *P*-450 с окисью углерода при 450 нм, а цитохрома *b*₅ — по разнице поглощения окисленной и восстановленной форм гемопротейда [4, 5] на спектрофотометре «Specord UV Vis». При определении ферментативной активности НАДФ·Н — цитохром *c* редуктазы в качестве акцептора электронов использовали цитохром *c*. Принцип метода основан на определении изменения поглощения акцептора электронов при его переходе из окисленной формы в восстановленную [6]. Измерения производили на спектрофотометре «Perkin-Elmer 555». Гидроксильную активность определяли по скорости диметилирования деметиланилина и *n*-гидроксилирования анилина [5]. Активность глюкозо-6-фосфатазы определяли по количеству образовавшегося фосфора при гидролизе глюкозо-6-фосфата [7]. Содержание белка определяли по Лоури [8]. Длительность гексеналового сна для контрольных животных и получавших 1,4-бенздиазепины учитывали по [9]. Полученные результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены данные, характеризующие содержание белка, цитохромов и удельные активности ферментов в микросомах печени контрольных животных, получавших диазепам, хлордиазепоксид и феназепам в дозе 50 мг/кг. Среди исследуемых показателей в этой серии опытов достоверные изменения отмечены только в удельном содержании цитохрома *P*-450 и скорости деметилирования деметиланилина в микросомах печени животных, которым вводили хлордиазепоксид.

Таблица 1

Содержание белка, цитохромов и удельная активность ферментов микросом печени крыс, получавших 1,4-бенздиазепины (50 мг/кг) в течение 4 сут (*n* = 8—12)

Препарат	Белок, мг на 1 г ткани	Цитохром <i>b</i> ₅	Цитохром <i>P</i> -450	<i>n</i> -Гидро- ксилиро- вание анилина	Демети- лирова- ние ди- метил- анилина	НАДФ·Н- цитохром <i>c</i> редук- таза
		нмоль на 1 мг белка		нмоль/мин в 1 мг белка		
Контроль	16,5±0,73	0,52±0,08	0,48±0,04	0,94±0,08	7,5±0,6	235±12
Диазепам	20,5±1,50	0,42±0,05	0,45±0,04	0,66±0,08	5,7±0,6	204±15
Феназепам	16,4±0,86	0,50±0,04	0,60±0,05	1,1±0,05	8,5±0,1	232±2,6
Хлордиазепоксид	17,9±0,83	0,58±0,08	0,66±0,06*	0,97±0,08	11±1,2*	246±33

* *P* < 0,05.

Введение экспериментальным животным всех изучаемых препаратов в дозе 100 мг/кг не вызывало изменения в содержании гемопротейдов, что коррелирует с неизменной скоростью *n*-гидроксилирования анилина и деметилирования деметиланилина (табл. 2). Результаты, полученные при изучении содержания цитохрома *P*-450 в микросомах печени белых крыс, получавших хлордиазепоксид в дозах 50 и 100 мг/кг (см. табл. 1, 2), оказались несколько неожиданными. Достоверное увеличение содержания цитохрома *P*-450 в печени животных, которым хлордиазепоксид вводили в дозе 50 мг/кг и незначительное его уменьшение в опытах, где использовали концентрацию препарата 100 мг/кг, по-видимому, может быть объяснено различными эффектами этих доз лекарственного вещества на гидроксилирующий комплекс гепатоцитов. В литературе имеются данные, свидетельствующие об индуцирующем и ингибирующем действии ряда препаратов на гидроксилирующий комплекс в зависимости от их дозы [10, 11]. Введение

Таблица 2
Содержание белка, цитохромов и удельная активность ферментов микросом печени крыс, получавших 1,4-бенздиазепины (100 мг/кг) в течение 4 сут
($n=8-12$)

Препарат	Белок, мг на 1 г ткани	Цитохром b_5	Цитохром P-450	n-Гидроксигиро- вание анилина	Деметилирование диметиланилина	НАДФ Н-цитохром с редуктаза	Глюкозо-6-фос- фатаз, мкм/мин в 1 мг белка
		нмоль на 1 мг белка			нмоль/мин в 1 мг белка		
Контроль	$19,4 \pm 1,34$	$0,28 \pm 0,025$	$0,36 \pm 0,034$	$0,88 \pm 0,20$	$8,6 \pm 0,6$	188 ± 6	$0,16 \pm 0,03$
Диазепам	$25,1 \pm 0,90^*$	$0,33 \pm 0,020$	$0,33 \pm 0,015$	$0,74 \pm 0,06$	$5,5 \pm 0,3$	$241 \pm 3^*$	—
Феназепам	$26,8 \pm 0,82^*$	$0,36 \pm 0,001^*$	$0,35 \pm 0,007$	$0,71 \pm 0,06$	$6,3 \pm 0,3$	$223 \pm 2^*$	$0,16 \pm 0,02$
Хлордиазепоксид	$22,6 \pm 0,51^*$	$0,31 \pm 0,040$	$0,32 \pm 0,130$	$0,61 \pm 0,05$	$9,1 \pm 0,9$	$238 \pm 3^*$	$0,27 \pm 0,02^*$

* $P < 0,05$.

животным препаратов в дозе 100 мг/кг (см. табл. 2) приводит к значительному увеличению белка микросом. Сопоставляя данные о содержании белка в микросомах и активности начального участка гидроксигирующего комплекса — НАДФ·Н-цитохром с редуктазы можно заключить, что его увеличение сопровождается активацией флавопротеида. В этом отношении бенздиазепины не отличаются от производных пиразола, которые также индуцируют активность НАДФ·Н-цитохром с редуктазы, не увеличивая при этом содержания гемопротеидов или активность гидроксигирирующих реакций [12].

Увеличение содержания белка в микросомах гепатоцитов животных, которым вводят химиотерапевтические средства, невозможно объяснить только индукцией гидроксигирующего комплекса. Такое увеличение может быть обусловлено и индукцией других ферментов, в частности УДФ-глюкуронилтрансферазы [13] или глюкозо-6-фосфатазы, которые также локализованы в цитомембранах, хотя в литературе имеются данные, свидетельствующие, что при введении экспериментальным животным чужеродных веществ глюкозо-6-фосфатаза не подвергается индукции [14] или даже происходит ее ингибирование [15, 16].

В последующих опытах нами было показано (см. табл. 2), что увеличение содержания белка в микросомах экспериментальных животных, получавших хлордиазепоксид, сопровождается активацией глюкозо-6-фосфатазы. В то же время такая закономерность отсутствовала при введении крысам феназепама.

Полученные результаты указывают на некоторые различия в действии диазепамов и феназепама, с одной стороны, и хлордиазепоксида — с другой, на гидроксигирующий комплекс и глюкозо-6-фосфатазу цитомембран. Это явление можно объяснить тем, что по физико-химическим характеристикам отмечается больше сходства между молекулами диазепамов и феназепама, чем с молекулой хлордиазепоксида. Подтверждением сказанному могут быть и опыты по потенцированию гексеналового сна диазепамом и хлордиазепоксидом. Так, если у контрольных животных время сна составляло $28 \pm 1,5$ мин, у животных, получавших феназепам — $29 \pm$

1,9 мин, то у животных, получавших хлордиазепоксид оно было значительно уменьшено — до $16 \pm 1,5$ мин. Не исключена возможность, что различные эффекты изучаемых препаратов обусловлены различием путей их метаболизма в организме животных [17, 18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Джагацпаян И. А., Клыгуль Т. А. — В кн.: Современные психотропные средства. М., 1970, вып. 3, с. 101—105.
2. Джагацпаян И. А., Клыгуль Т. А. — Фармакол. и токсикол., 1971, № 4, с. 527—531.
3. Вихляев Ю. И., Клыгуль Т. А. — В кн.: Успехи в создании новых лекарственных средств. М., 1973, с. 70—85.
4. Omura T., Sato R. — J. biol. Chem., 1964, v. 239, p. 2370—2358.
5. Карузина И. И., Арчаков А. И. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 60—62.
6. Dallner G. — Acta path. microbiol. scand., 1963, Suppl. 166, p. 94.
7. Zakim D., Vessey D. — Meth. biochem. Analys., 1973, v. 21, p. 1—39.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
9. Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. М., 1974, с. 27.
10. Remmer H. J. — Mond. Pharm., 1969, v. 12, p. 169—185.
11. Remmer H. — Rev. canad. Biol., 1972, v. 31, p. 192—222.
12. Marselos M., Torrönen R., Alakuijala P. et al. — Toxicology, 1977, v. 8, p. 251—261.
13. Parke D. V. — In: Enzyme Induction. Ed. D. V. Parke. London, 1975, p. 207.
14. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975, с. 250—251.
15. Lygre D. V. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 341, p. 291—297.
16. Menard D., Penasse W., Drochmans P. et al. — Histochemie, 1974, v. 38, p. 229—239.
17. Rendic S., Sunjic V., Kajfez F. et al. — Acta pharm. jugosl., 1975, v. 25, p. 135—153.
18. Богатский А. В., Головенко Н. Я., Андронати С. А. и др. — В кн.: Физиологически активные вещества. Киев, 1975, вып. 7, с. 79.

Поступила 18/XII 1978 г.

EFFECT OF TRANQUILIZERS FROM 1,4-BENZODIAZEPINE SERIES ON THE ACTIVITY OF HYDROXYLATING COMPLEX AND OF GLUCOSE-6-PHOSPHATASE IN RAT HEPATOCYTES

N. Ya. Golovenko, E. I. Orlyuk

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

Intraperitoneal administration of diazepam and phenazepam into rats /at a dose 50 mg/kg/ within 4 days did not induce liver microsomal enzymes. After administration of chlordiazepoxide at the same dose content of cytochrome P-450 was increased and the rate of dimethylaniline demethylation was elevated. Content of protein as well as NADPH-cytochrome-c-reductase and glucose-6-phosphatase activities were increased after intraperitoneal administration of all the preparations at a dose 100 mg/kg within 4 days. Experiments on the potentiation of hexenal effect demonstrated the decrease in the time of sleep in animals, treated with chlordiazepoxide at a dose 100 mg/kg of body weight.

УДК 612.64'124-085.23

Д. М. Фалалеева, М. Ю. Васильев, В. В. Калашников, Ю. С. Татарinov

ИЗУЧЕНИЕ БИОСИНТЕЗА α -ФЕТОПРОТЕИНА В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА

Кафедра биохимии и проблемная лаборатория по иммунохимии злокачественных и эмбриональных тканей II Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова

α -Фетопротейн (АФП), идентифицированный впервые в химически индуцированной гепатоме мышей [1] и в сыворотке крови при гепатоцеллюлярном раке у человека [2], является сывороточным белком, который синтезируется главным образом печенью плода и желточным мешком, а за-

тем секретируется в кровь. На ранних этапах эмбриогенеза его продукция возрастает, но к моменту родов уменьшается, и вскоре после рождения он исчезает из кровотока. Обнаружение АФП в сыворотке крови человека легло в основу теста для диагностики гепатоцеллюлярного рака и эмбриональных тератобластом человека [3]. Применение высокочувствительных методов определения АФП позволило обнаружить его при гепатопатиях [4], опухолях желудочно-кишечного тракта [5], поджелудочной железы [3], легкого [6].

Первые работы по изучению биосинтеза АФП в культуре тканей эмбриональных органов показали, что он синтезируется только в печени и желточном мешке [7]. В последующем АФП был обнаружен в других эмбриональных органах — желудочно-кишечном тракте, почке и в одном случае в культуре ткани эмбрионального легкого [8, 9]. Это позволило предположить, что опухолевая ткань соответствующих органов также способна синтезировать и секретировать в кровь АФП, а его количественное определение может быть использовано для диагностики опухолевого роста.

В настоящей работе приведены результаты иммунорадиоавтографического изучения синтеза АФП в суспензионной культуре ткани эмбриональных органов человека.

Методика

Эмбриональные органы человека 6—12 нед эмбриогенеза получали от здоровых беременных женщин после медицинского аборта из родильных домов Москвы. Материал доставляли в стерильной стеклянной посуде на льду. Инкубацию культуральных проб начинали не позднее чем через 1 ч после получения материала.

Культура ткани. Для культивирования тканей применяли основную среду Игла, содержащую 10% эмбриональной сыворотки телят. Органы, отобранные для изучения (печень, желудочно-кишечный тракт, легкое, почка, кости, сердце, мозг, мышцы), промывали в растворе Хенкса, содержащем 1000 ЕД/мл пенициллина и 500 мг/мл стрептомицина, измельчали бритвой на кусочки объемом около 1 мм³ и помещали в специальный сосуд для культивирования, предварительно заполненный 5 мл культуральной среды с гидролизатом ¹⁴C-хлореллы (ЧССР). Удельная радиоактивность гидролизата составляла 20 мкКи/мл. Во II серии опытов использовали отдельные меченые аминокислоты — ¹⁴C-фенилаланин, метионин, лизин (по 20 мкКи/мл).

Инкубацию проводили в термостате при 37°C в течение 6—12 ч при медленном помешивании в воздушной среде. Затем надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 6000 об/мин, диализовали против 0,5 М веронал-медиалового буфера pH 8,6 и лиофилизировали. Контрольные пробы, обработанные аналогичным образом, инкубировали при 4°C, а затем лиофилизировали. Опытные и контрольные лиофилизаты растворяли в 0,5 мл физиологического раствора и исследовали.

Иммуноауторадиография. К опытными и контрольным пробам добавляли такое количество стандартного антигена¹, чтобы обеспечить оптимальное соотношение антиген — антитело для формирования преципитата. Электрофорез проводили в 1% агаровом геле «Дифко», приготовленном на веронал-медиаловом буфере ионной силы 0,05, pH 8,6. Подробное описание техники постановки иммунофореза с последующей ауторадиографией описано ранее [10]. После завершения электрофореза параллельно оси миграции белков в траншеи заливали моноспецифическую антисыворотку к АФП. Иммунопроявление продолжалось 24 ч во влажной камере. Затем стекла отмывали в забуференном физиологическом растворе pH 7,2, фотографировали в рассеянном свете и высушивали под фильтровальной бумагой. Высушенные стекла наклеивали на пленку, предназначенную для рентгенографических исследований (РФ-3), зажимали чистым стеклом и оставляли в темном месте для ауторадиоавтографии на 10—30 дней.

Результаты и обсуждение

Результаты иммуноауторадиографического анализа биосинтеза АФП *in vitro* в культуре тканей эмбриональных органов представлены в таблице.

¹ В качестве стандартного антигена и моноспецифической антисыворотки к АФП использовали реактивы иммунодиагностикума на первичный рак печени и тератобластом человека (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва).

Интенсивность синтеза АФП определяли по степени засветления пленки преципитатом и оценивали по 4-балльной системе (от + до ++++). Мы поставили 6 экспериментов для изучения биосинтеза АФП. Для обнаружения синтезируемого АФП в 1—4-м опыте использовали полный набор незаменимых аминокислот в виде гидролизата экстракта хлореллы. В 5-м и 6-м опытах использовали отдельные аминокислоты, меченные ^{14}C . Все другие условия эксперимента были идентичны.

В 2 последних опытах АФП синтезировался только тканью печени, что, по-видимому, объясняется особенностями условий этих опытов. На рисунке, см. вклейку приведены радиоавтографы иммуноэлектрофореграмм I серии эксперимента с включением в синтез полного набора незаменимых аминокислот. На автографах видно включение радиоактивной метки в молеку-

Результаты иммунорадиоавтографического исследования

Эмбриональный орган (ткань) 6—12 нед развития	Номер эксперимента					
	1	2	3	4	5	6
Хорион	—	—	—	—	—	—
Печень	+++	+++	++++	++++	+	+
Желудочно-кишечный тракт	+	+	++	+++	—	—
Почка	+	—	+	+	—	—
Легкое	+	—	+	+	—	—
Кости	—	—	+	+	—	—
Сердце	—	—	—	—	—	—
Мышцы	—	—	—	—	—	—
Мозг	—	—	—	—	—	—

лу АФП в культуре эмбриональных тканей печени, желудочно-кишечного тракта, почки, легкого и костей. Наиболее интенсивный синтез АФП характерен для печени, значительно меньший — для желудочно-кишечного тракта. В культуре ткани почки, легкого и костей интенсивность свечения дуг преципитации была примерно одинаковой. В таблице дана сравнительная оценка величины синтеза АФП разными органами плода, определенная по степени засветки автографа дугой преципитации, содержащей радиоактивный АФП. Нам ни разу не удавалось обнаружить синтез АФП в тканях сердца, кожи, мышц, мозга и хориона, а также в контрольных пробах, инкубированных при 4°C .

Полученные результаты свидетельствуют о том, что местом синтеза АФП является не только печень эмбриона человека, но и желудочно-кишечный тракт, почка, легкое, хотя этот процесс здесь значительно снижен. Судя по интенсивности включения меченых аминокислот, печень является основным местом продукции АФП. Применение экстракта хлореллы, содержащей полный набор незаменимых аминокислот, по-видимому, обеспечивало воспроизводимость результатов и высокую чувствительность метода, что позволило обнаружить малые количества синтезируемого антигена почкой, желудочно-кишечным трактом, легким и костной тканью.

Обнаружение АФП в эмбриональной костной ткани подтверждает гипотезу о синтезе АФП мезенхимой [11].

Если принять во внимание сведения об обнаружении АФП в крови больных с опухолями непеченочного происхождения, создается впечатление о существовании тесной связи между уровнем синтеза АФП в эмбриональных органах и в опухолях этих же органов у взрослого человека. Наибольшие количества АФП синтезирует печень плода, у взрослого индивидуума самый высокий уровень синтеза определен при гепатоцеллюлярном раке и тератокарциномах [2, 3, 7]. В значительно меньших количествах АФП синтезируется эмбриональным желудочно-кишечным трактом, почкой, лег-

ким. В сыворотке крови больных с опухолями соответствующих органов отмечается более низкий уровень по сравнению с гепатоцеллюлярным раком синтезируемого АФП [3—8].

Прослеживая этапы эмбрионального развития человека и принимая во внимание результаты синтеза АФП, можно заметить, что органы, синтезирующие АФП, являются производными энтодермы. Причем органы, происходящие из переднего отдела средней кишечной трубки, — печень, желудочно-кишечный тракт, поджелудочная железа — синтезируют наибольшие количества, а легкое, почки и кости, происходящие из других осевых органов энтодермы, — меньшие количества АФП.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелев Г. И.* — В кн.: Международный противораковый конгресс. 8-й. Труды. М., 1963, т. 3, с. 224—227.
2. *Татаринов Ю. С.* — В кн.: Всесоюзный биохимический съезд. 1-й. Труды. М.-Л., 1963, т. 2, с. 274.
3. *O'Connor G. T., Tatarinov Yu. S., Abelev G. I. et al.* — Cancer (Philad.), 1970, v. 25, p. 1091—1098.
4. *Masopust J., Kithier K., Radl J. et al.* — Int. J. Cancer, 1968, v. 3, p. 364—373.
5. *McIntire K. R., Waldmann T. A., Moertel C. G. et al.* — Cancer Res., 1975, v. 35, p. 991—996.
6. *Lie-Injio L. E., Calchvell J., Ganesan S. et al.* — Cancer (Philad.), 1976, v. 38, p. 341—346.
7. *Gitlin D., Boesman M.* — J. clin. Invest., 1967, v. 46, p. 1010—1016.
8. *Breborowicz J.* — Newsletters and References, 1978, № 4, p. 54—56.
9. *Gitlin D., Perricelli A., Gitlin G.* — Cancer Res., 1972, v. 32, p. 979—982.
10. *Абелев Г. И., Бакиров Р. Д.* — В кн.: Иммунохимический анализ. М., 1968, с. 271—295.
11. *Sell S.* — Newsletters and References, 1978, № 4, p. 174—182.

Поступила 2/1 1979 г.

BIOSYNTHESIS OF α -FETOPROTEIN IN TISSUE CULTURE OF HUMAN EMBRYON

D. M. Falaleyeva, M. Yu. Vasil'ev, V. V. Kalashnikov, Yu. S. Tatarinov

Chair of Biochemistry, Laboratory on Problems of Immunochemistry of Malignant and Embryonal Tissues, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Labelled amino acids from ^{14}C -chlorella hydrolysate incorporated into α -fetoprotein during «in vitro» cultivation of fetal liver, gastrointestinal tract, lung, kidney and bone tissues, obtained with in 6-12 weeks of pregnancy. α -Fetoprotein was apparently synthesized in tissues of entodermal origin.

УДК 616-008.922.1-008.64-07:616.36-008.931-074

С. А. Струмило, С. К. Мацюк, В. В. Виноградов

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ТИАМИНДИФОСФАТА В ПЕЧЕНИ ПРИ ОСТРОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

*Отдел регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

В условиях кислородного голодания изменяется функционирование тиаминдифосфат (ТДФ)-специфичных ферментов [1, 2]. Данное обстоятельство предопределяет интерес к исследованию обмена ТДФ при указанной патологии. Вопрос этот уже изучался [1, 3, 4], однако до сих пор некоторые его принципиальные моменты остаются невыясненными. В частности, неизвестно, реагирует ли тиаминпирофосфокиназа (ТПФК) на гипоксическое воздействие; какие эндогенные модификаторы могут влиять на скорость ферментативных процессов биосинтеза и деградации ТДФ и как это отражается на уровне кофермента в условиях острой кислородной недостаточ-

ности. Объектом изучения особенностей метаболизма ТДФ при гипоксии мы избрали печень — орган, в котором наиболее интенсивно протекает обмен витаминов.

Методика

Использовали крыс-самцов массой 180 ± 20 г. Обмен ТДФ изучали с помощью методического приема, заключающегося в нагрузке интактных и подвергавшихся гипоксии животных тиамин-бромидом в дозе 20 мг на 100 г массы. Показанный нами ранее [5] резкий подъем уровня ТДФ в печени крыс через 1 ч после введения такого количества витамина, очевидно, дает адекватное представление о тиаминфосфорилирующей способности, а последующее его снижение, по всей вероятности, характеризует скорость утилизации кофермента. Сразу после подкожного введения витамина B_1 подопытных крыс помещали в вентилируемую барокамеру и снижали атмосферное давление до 198 мм рт. ст. Спустя 30, 60 и 120 мин животных декапитировали. В части экспериментов крыс подвергали аналогичным гипоксическим воздействиям без введения тиамин или через 2 ч после его инъекции. Этионин в дозе 50 мг на 100 г массы вводили внутривенно за 5 ч до забоя [6]. Все опытные группы имели соответствующий контроль. ТДФ в тканях определяли ферментативным методом с использованием выделенной из пивных дрожжей анопируватдекарбоксилазы [7] и алкогольдегидрогеназы («Реанал», Венгрия). Тиаминпирофосфокиназную активность определяли по наработке ТДФ за 30 мин при 37°C в 1 мл инкубационной смеси, включающей $2 \cdot 10^{-2}$ М трис-малеатный буфер (рН 5,2), $2 \cdot 10^{-4}$ М тиамин, $5 \cdot 10^{-3}$ М АТФ; $1 \cdot 10^{-2}$ М MgSO_4 и 1,2—1,5 мг белка гиалоплазматической фракции печени. Об активности ферментов, расщепляющих ТДФ, судили по его убыли при инкубации в среде, описанной ранее [8]. Содержание нефосфорилированного тиамин в печени контролировали тиохромным методом [9]. Очищенную ТПФК из печени крыс (удельная активность 0,7 ед.) получали по известной методике [10], исключая стадию гелефильтрации на сефадексе G-200.

Результаты и обсуждение

Опыт с нагрузкой тиамин показал, что подъем уровня ТДФ в печени крыс, находившихся в разреженной атмосфере, происходит гораздо медленнее, чем у контрольных животных (рис. 1, А). Это отставание досто-

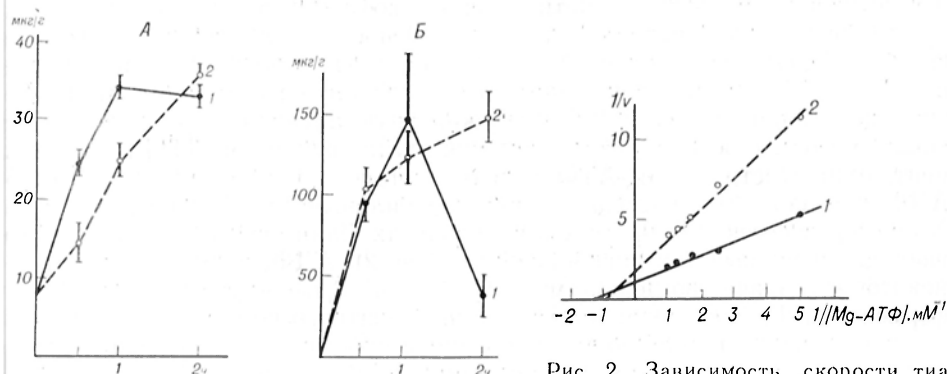


Рис. 1. Содержание ТДФ (А) и нефосфорилированного тиамин (Б) в печени контрольных (1) и подвергнутых гипоксии (2) крыс после инъекции витамина B_1 .

Рис. 2. Зависимость скорости тиаминпирофосфокиназной реакции от концентрации Mg-ATP в обратных величинах.
1 — без АТФ; 2 — в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ М АДФ.

верно как для 30-минутного, так и для часового интервала времени после инъекции. Спустя 2 ч, когда у контрольных крыс уровень ТДФ начинает снижаться, показатели выравниваются, что, по всей вероятности, связано с разной скоростью расщепления кофермента. Концентрация нефосфорилированного тиамин через 30 и 60 мин после инъекции практически одинакова в печени контрольных и содержащихся в барокамере животных (рис. 1, Б). В то же время отчетливые различия накопления ТДФ могут свидетельствовать о снижении скорости биосинтеза кофермента при избы-

точном поступлении предшественника в условиях острой гипобарической гипоксии. На нарушение фосфорилирования тиамин в тканях при кислородной недостаточности указывали и исследователи [1, 4], применявшие иные методические подходы. Вместе с тем активность ТПФК из печени интактных и подвергнутых гипоксии крыс, определяемая *in vitro* при оптимальном насыщении кофакторами, статистически не различается (табл. 1). *In vivo* каталитические возможности ТПФК, видимо, ограничиваются доступностью АТФ-основного донора пирофосфатных группировок. Концентрация АТФ в тканях при гипоксических воздействиях снижена [11—13]. Чтобы выяснить, отражается ли дефицит АТФ на скорости образования ТДФ из избыточно вводимого витамина В₁, мы провели эксперимент с на-

Т а б л и ц а 1
Тиаминпирофосфокиназная (ТПФК) и ТДФ-
расщепляющая активность печени интактных и
подвергнутых 2-часовой гипоксии крыс ($P > 0,1$)

Группа	n	ТПФК	Убыль ТДФ
		нмоль/ч на 100 мг белка	мкмоль/ч на 100 мг белка
Контроль	6	214,3±10,4	78,8±11,8
Гипоксия	6	197,3±20,6	79,8±13,1

грузкой животных этионином, который резко уменьшает АТФ в печени [6]. Оказалось, что этионин действительно несколько замедляет накопление ТДФ в ткани печени. Так, через 1 ч после инъекции тиамин концентрация кофермента в печени контрольных животных составила 34,6±1,3 мкг на 1 г ткани, а в печени крыс,

получавших этионин, 28,1±2,3 мкг на 1 г ткани ($P < 0,05$). Однако эта разница менее выражена, чем в опыте с гипоксическим воздействием (см. рис. 1, А). Очевидно не только пониженный уровень АТФ, но и другие механизмы лежат в основе торможения ферментативного синтеза ТДФ при гипоксии. Используя препараты очищенной ТПФК из печени крыс, мы проверили возможность различного влияния на активность фермента окисленных и восстановленных форм никотинамидных коферментов, соотношение между которыми при кислородной недостаточности существенно изменяется [13, 14]. Однако выяснилось, что в пределах физиологических концентраций (10^{-4} — 10^{-3} М) как окисленные, так и восстановленные пиридиннуклеотиды не влияют на тиаминпирофосфокиназную активность *in vitro*. Исследование зависимости скорости реакции, катализируемой ТПФК, от концентрации субстрата (Mg-АТФ^{-2}) в отсутствие и в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ М АДФ показало, что последний является сильным ингибитором фермента. Характер пересечения прямых в координатах Лайнуивера — Берка указывает на смешанный тип ингибирования (рис. 2). АДФ, видимо, захватывает некоторое количество ионов магния [15], которые служат активаторами фермента [10] и участвуют в образовании хелатного комплекса с АТФ [15], а затем успешно конкурируют с истинным субстратом за активный центр. Как следует из рис. 2, при концентрации АДФ, которая близка к уровню нуклеотида в интактных гепатоцитах ($0,7$ — $1,5 \cdot 10^{-3}$ М), скорость тиаминпирофосфокиназной реакции снижается примерно наполовину. Необходимо отметить, что, по данным некоторых авторов [12, 13], в условиях гипоксии наряду с дефицитом АТФ возрастает количество АДФ в тканях. Таким образом, изменение не только уровня АТФ, но и АДФ может быть существенным фактором замедления процесса фосфорилирования тиамин при кислородной недостаточности.

Для выявления возможных изменений скорости деградации ТДФ в печени при гипоксии мы помещали часть животных в барокамеру после достижения пика концентрации кофермента, как это описано в методическом разделе. Эксперимент показал, что убыль ТДФ в печени крыс, поднятых на «высоту» 10 000 м, осуществляется медленнее, чем у контрольных животных (рис. 3). Такая динамика, по-видимому, адекватно отражает разную ско-

рость процессов деградации кофермента. Наряду с этим *in vitro* не отмечено достоверных различий между убылью экзогенного ТДФ в пробах, содержащих гомогенаты печени интактных и подвергнутых гипоксии крыс (см. табл. 1). Интересно, что в опытах на крысах после 6-часового гипоксического воздействия отмечена активация тиаминдифосфатазы [11]. Как и в случае с ТПФК, здесь мы обнаружили также некоторое несоответствие между максимальной активностью ТДФ-расщепляющих ферментов в оптимальных условиях определения и их действительным участием в метаболизме ТДФ *in vivo*. Сравнение активности ТПФК и активности ТДФ-гидролизующих ферментов, которая примерно в 300 раз больше (см. табл. 1) говорит в пользу того, что последние функционируют далеко не на полную мощность. В противном случае было бы невозможным поддержание в печени необходимой концентрации кофермента. Действительно, в норме в тканях значительная часть, например, ТДФ-азы находится в латентном состоянии [17]. В таких условиях особо важную роль должны играть модификаторы ферментативной активности. Так, понижение при гипоксии уровня АТФ [11—13], который служит активатором ТДФ-азы [18], по всей вероятности, отражается однонаправленно не только на фосфорилировании тиамин, но и на скорости расщепления ТДФ, о чем свидетельствуют опыты с несколько акцентуированной ситуацией, созданной введением витамина В₁

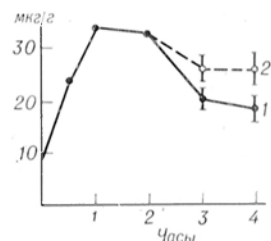


Рис. 3. Содержание ТДФ в печени контрольных (1) и подвергнутых гипоксии (2) крыс через 3 и 4 ч после инъекции тиамин.

Таблица 2
Содержание ТДФ (в мкг/г) в тканях интактных и подвергнутых 2-часовой гипоксии крыс ($P > 0,1$)

Группа	n	Печень	Сердце	Мозг
Контроль	6	7,44 ± 0,63	5,87 ± 0,60	3,66 ± 0,09
Гипоксия	6	8,11 ± 0,53	5,31 ± 0,65	3,62 ± 0,13

(см. рис. 1, 3). В качестве модификаторов ТДФ-азы могут также выступать никотинамидные коферменты, восстановленные формы которых, как показано нами ранее [8], угнетают фермент сильнее, чем окисленные. В условиях кислородной недостаточности повышается восстановленность пиридиннуклеотидов [13, 14], которые, очевидно, вносят свой вклад в механизм замедления деградации ТДФ. Что касается интегрального показателя обмена ТДФ — его содержания в тканях без дополнительного введения тиамин, то оно, как видно из табл. 2, достоверно не изменяется в печени, сердце и мозге крыс при 2-часовом пребывании на «высоте» 10 000 м. Объяснением этому может служить однонаправленность влияния гипобарической гипоксии на скорость процессов биосинтеза и утилизации тиаминдифосфата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хмелевский Ю. В. Обмен тиамин и активность тиаминных ферментов в организме при некоторых гипоксических состояниях. Автореф. дис. докт. Киев, 1967.
2. Колотилова А. И., Мобди И. А., Говорова Л. В. и др. — Сб. работ Ин-та цитологии АН СССР. Ленинград, 1977, вып. 17, с. 59—61.
3. Хмелевский Ю. В. — Укр. біохім. ж., 1960, № 3, с. 412—417.
4. Kambe T. — Vitamins, 1964, v. 30, p. 43—47.
5. Виноградов В. В., Струмило С. А., Мандрик К. А. и др. — Вопр. мед. химии, 1978, № 3, с. 383—389.
6. Clark J. B., Pinder S. — Biochem. J., 1969, v. 114, p. 321—330.

7. Ullrich J. — Meth. Enzymol., 1970, v. 18-A, p. 109.
8. Струмило С. А., Тарасов Ю. А., Виноградов В. В. — Изв. АН БССР. Сер. биол., 1975, № 1, с. 62—65.
9. Елисеева Г. Д. — В кн.: Витамины. Киев, 1953, вып. 1, с. 38.
10. Арцукевич И. М., Воскобоев А. И., Островский Ю. М. — Вопр. мед. химии, 1977, № 2, с. 203—210.
11. Chaudry I. H., Sayeed M. M., Baue A. E. — Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1976, v. 54, N 5, p. 750—756.
12. Vergnes H., Moret P. R. — Enzyme, 1976, v. 21, N 6, p. 516—523.
13. Березовский В. А. и др. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности. Киев, 1978, с. 65.
14. Lai F. M. H., Miller A. T. — Comp. Biochem. Physiol., 1973, v. 44-B, N 1, p. 307—312.
15. Ленинджер А. Биохимия. М., 1976, с. 336, 480.
16. Ньюсхолм Э., Спарт К. Регуляция метаболизма. М., 1977, с. 380.
17. Kurijama Y. — J. biol. Chem., 1972, v. 247, p. 2979.
18. Yamazaki M., Hayaishi O. — Ibid., 1968, v. 243, p. 2934.

Поступила 11/1 1979 г

PECULIARITIES OF THIAMIN DIPHOSPHATE TURNOVER IN LIVER TISSUE UNDER CONDITIONS OF HYPOBARIC HYPOXIA

S. A. Strumilo, S. K. Matsyuk, V. V. Vinogradov

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

Rates of thiamin diphosphate accumulation in rat liver tissue and its subsequent depletion were decreased within the first hour after vitamin B₁ administration into the animals with oxygen insufficiency. Hypoxia apparently inhibited simultaneously the processes of thiamin diphosphate biosynthesis and degradation, as a result of which content of the coenzyme was unaltered in tissues under conditions of usual intake of thiamin. The data obtained suggest that the activity of enzymes, participating in thiamin diphosphate turnover and estimated in vitro do not reflect their real functioning in the whole organism. Importance of ATP, ADP and pyridine nucleotides is considered as regulating agents of enzymes participating in thiamin diphosphate turnover under hypoxia.

УДК 615.355:577.152.344].015.45:612.123/.124

И. М. Карманский, А. Л. Пичугин, В. О. Шпикунтер

ДЕЙСТВИЕ КАТЕПСИНА D АОРТЫ НА СЫВОРОТОЧНЫЕ ЛИПОПРОТЕИДЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Общеизвестно важное значение липопротеидов сыворотки крови в патогенезе атеросклероза. Нарушения метаболизма этих липопротеидов в стенках сосудов могут играть существенную роль в образовании атероматозных бляшек. Тем не менее превращения липопротеидов под влиянием протеолитических ферментов изучены недостаточно. Так, имеется всего несколько работ о действии на липопротеиды протеиназ желудочно-кишечного тракта — трипсина [1], химотрипсина [2], пепсина [3], микроорганизмов — проназы [1], растений — папаина [2]. Судя по имеющимся у нас данным, изучение действия на сывороточные липопротеиды протеиназ аорты до сих пор не проводилось.

В настоящем сообщении описываются предпринятые нами исследования действия катепсина D, выделенного из аорт свиней, на липопротеиды низкой плотности (ЛНП) из сыворотки крови человека.

Методика

ЛНП (коэффициенты флотации 0—20 S, плотность 1,006—1,063 г/см³) выделяли из сыворотки крови людей-доноров с помощью препаративного ультрацентрифугирования [5] и хранили в растворе с NaCl и KBr (плотность 1,063 г/см³) при 4°C не

более 2 нед. Катепсин D выделяли из стенки аорты свиней методом аффинной хроматографии на пепстатин-сефарозе, как описано ранее [4]. Использовали препараты катепсина D с удельной активностью 50 ед/мг. Гидролиз ЛНП катепсином D проводили следующим образом: к 0,5 мл исходного раствора ЛНП (около 10 мг) прибавляли 4,5 мл 0,1% раствора ЭДТА, рН которого был доведен 0,1 н. HCl до 3,0, затем добавляли 0,75 мл раствора катепсина D (около 0,15 мг белка). Конечное значение рН инкубационной смеси равнялось 4,4. Инкубацию вели при 37°C, для определения степени гидролиза к аликватам инкубационной смеси (0,5 мл) приливали равный объем 10% ТХУ. Образовавшийся осадок отделяли фильтрованием и в фильтрате определяли концентрацию неосаждаемых ТХУ пептидов, используя для этого метод Лоури [6]. Концентрацию белка в исходных препаратах ЛНП также определяли по Лоури, стандартом служил бычий сывороточный альбумин.

При проведении опытов по изучению продуктов гидролиза ЛНП ферментом инкубационную среду подщелачивали до рН 7,3, при котором катепсин D неактивен. Для этого к отобранной из инкубационной среды пробе (0,5 мл) добавляли 0,035 мл 0,1 М трис. Полученный раствор вносили в один из секторов двухсекторной ячейки ультрацентрифуги «Спинко Е»; во второй сектор вносили раствор с тем же солевым составом, но без ЛНП и фермента. Скорость вращения ротора равнялась 52 640 об/мин.

Результаты и обсуждение

Как отмечалось выше, гидролиз ЛНП катепсином D проводили при рН 4,4. Контрольные опыты (без добавления фермента) показали, что при этом рН (с последующим подщелачиванием до рН 7,3) заметных изменений седиментационных свойств ЛНП не происходит в течение 60 мин. При более длительной инкубации на седиментационных диаграммах появлялись агрегаты ЛНП, количество которых достигало 20% (судя по площадям пиков) через 4 $\frac{1}{2}$ ч. При этом не наблюдалось изменений коэффициента седиментации и формы пика оставшихся ЛНП. Последнее обстоятельство позволяло судить о характере протеолитических превращений исходных ЛНП даже на поздних сроках инкубации с ферментом.

Степень гидролиза ЛНП катепсином D определяли по увеличению количества растворимых в ТХУ пептидов, дающих реакцию Лоури. Как видно на рис. 1, при отношении массы препарата фермента к массе белка ЛНП, равном 1 : 65, через 60 мин степень гидролиза ЛНП составляет приблизительно 15%, а через 4 $\frac{1}{2}$ ч — около 30%. При четырехкратном увеличении количества фермента степень гидролиза составляла около 40% за 4 $\frac{1}{2}$ ч.

Данные, получаемые при определении количества растворимого в ТХУ материала, могут не соответствовать числу гидролизованных пептидных связей или количеству отщепленного от ЛНП белка. Однако, как будет сказано ниже, данные аналитического ультрацентрифугирования согласуются с указанными величинами степени гидролиза ЛНП.

Для анализа макромолекулярных превращений ЛНП под действием катепсина D изучали седиментацию ЛНП и продуктов их превращений в аналитической ультрацентрифуге. При этом в качестве растворителя использовали смесь 0,04 МКВг: 0,042 М NaCl, 2 мМ ЭДТА, 6 мМ трис рН 7,3. Седиментационные диаграммы продуктов превращения ЛНП приведены на рис. 2, из которого видно, что частично гидролизованные ЛНП (вплоть до степени гидролиза около 20%) седиментируют одним гомогенным пиком.

При 7% степени гидролиза ЛНП наблюдалось снижение коэффициента седиментации продуктов превращения ЛНП с 6,4 до 5,8 S. Это снижение обусловлено, очевидно, увеличением парциального удельного объема про-

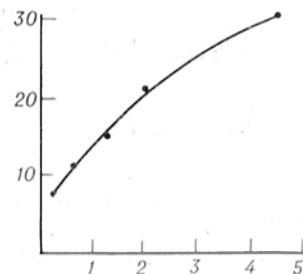


Рис. 1. Зависимость степени протеолиза катепсином D ЛНП от времени.

По оси абсцисс — время (ч); по оси ординат — отношение количества растворимых в ТХУ продуктов протеолиза к количеству белка исходных липопротеидов (%).

дуктов распада за счет увеличения относительного содержания липидных компонентов. Обращает на себя внимание быстрое исчезновение пика, соответствующего исходным ЛНП, что может быть связано с наличием в ЛНП легко доступных пептидных связей, которые и гидролизуются в первую очередь. По мере увеличения степени гидролиза ЛНП происходит дальнейшее уменьшение коэффициента седиментации образующихся продуктов вплоть до 4,5 S (при степени гидролиза около 30%) и появляются небольшие количества гетерогенного медленно седиментирующего материала. После этого уменьшение коэффициента седиментации основной части продуктов гидролиза прекращается, а при повышении степени гидролиза до 40% начинает уменьшаться площадь пика 4,5 S-компонента на седиментационных

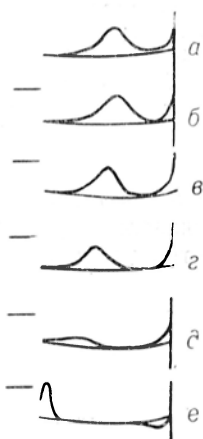


Рис. 2. Седиментационные диаграммы ЛНП и продуктов их протеолиза катепсином D.

а — ЛНП, инкубированные 60 мин при pH 7,3; б — ЛНП, инкубированные 60 мин при pH 4,4 без фермента, затем подщелоченные до pH 7,3; в, г, е — продукты протеолиза после инкубации в течение 13, 120, 270 и 270 мин соответственно. Коэффициенты седиментации (по вершинам пиков) основных компонентов для а—е равны соответственно 6,4, 6,4, 5,8, 5,1, 4,5 и 4,5. На диаграмме е видны флотирующие компоненты. Скорость вращения ротора 52 640 об/мин; время снимков 75 мин, е — 11 мин. Растворитель: 0,04 M KBr; 0,042 M NaCl, 2 mM ЭДТА, 6 mM трис-буфер pH 7,3.

При допущении наличия аддитивности плотностей компонентов ЛНП и продуктов их превращения можно рассчитать, что флотация продуктов распада (в данном растворителе) должна начаться при отщеплении около 40%. Эта величина соответствует величине степени гидролиза, определяемой для начала флотации указанным методом Лоури.

При интенсивном гидролизе ЛНП образуются агрегаты продуктов распада с наличием нерастворимых частиц, о чем свидетельствует помутнение раствора. Не исключена возможность того, что такие плохо растворимые продукты метаболизма ЛНП под действием аортального катепсина D могут образовываться при тех или иных обстоятельствах и в стенках артерий и тем самым играть роль в формировании атероматозных бляшек [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Margolis S., Langdon R. G. — J. biol. Chem., 1966, v. 241, p. 485.
2. Bernfeld P., Kelley T. F. — Ibid., 1964, v. 239, p. 3341.
3. Карманский И. М. — Вопр. мед. химии, 1977, № 4, с. 530.
4. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. — J. clin. Invest., 1955, v. 34, p. 1345.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. — et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 256.
7. Карманский И. М., Шпикитер В. О. — Бюлл. экспер. биол., 1977, № 8, с. 173.

Поступила 16/1 1979 г.

ACTION OF AORTIC CATHEPSIN D ON SERUM LOW DENSITY LIPOPROTEINS

I. M. Karmansky, A. L. Pichugin, V. O. Shpikiter

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

Action of aortic cathepsin D on low density lipoproteins /LDL/ from human serum was studied by means of analytical ultracentrifugation. Cathepsin D intensively hydrolysed LDL, leading to decrease in the sedimentation coefficients of the product formed.

The product of degradation of LDL possessing a sedimentation coefficient of 4.5 S /in 0.04 M KBr; 0.042 M NaCl, 2 mM EDTA, 6 mM Tris, pH 7.3 /contained apparently the minimal amount of proteins, which could still maintain the stability of partially hydrolysed LDL. When the degree of hydrolysis reached 40%, a heterogenous mixture, containing the flotating and slowly sedimenting products, was formed. These products gradually lost their solubility. The data obtained suggest that the insoluble products of the proteolysis may be formed in aortic wall in some disorders of the lipoprotein metabolism

УДК 577.152.344

А. Л. Пичугин, О. В. Казакова

ВЫДЕЛЕНИЕ КАТАПСИНА D ИЗ АОРТЫ С ПОМОЩЬЮ ПЕПСТАТИН-СЕФАРОЗЫ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Изучение протеолитических ферментов стенок сосудов, в частности аорты, представляет интерес для понимания превращения сывороточных липопротеидов и их роли в образовании атероматозных бляшек [1]. Протеолитические ферменты сосудов изучены сравнительно мало [2]. Имеется сообщение о выделении катепсина D из аорты крупного рогатого скота [3], однако в этом случае применялась сложная многостадийная процедура с использованием гель-фильтрации, ионообменной хроматографии и лиофильной сушки на промежуточных стадиях.

Мы предприняли исследование с целью выделения катепсина D из аорты путем аффинной хроматографии на пепстатин-сефарозе, которая успешно применялась для получения этого фермента из других источников [4, 5].

М е т о д и к а

Аорты свиней сразу же после умерщвления на мясокомбинате разрезали вдоль, соскабливали наружную ткань, промывали водой и замораживали при -40°C . Замороженную массу хранили (не более 2 нед) в холодильнике при -15°C до дальнейшей обработки. Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавт. [6] с измерением оптической плотности при 750 нм на спектрофотометре СФ-4А. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (фирма «Реанал»).

Протеолитическую активность определяли по методу Ансона [7]. В качестве субстрата применяли гемоглобин (фирма «Мерк»). К 1 мл содержащего протеиназу раствора добавляли 1 мл 1% раствора гемоглобина в 0,1 М цитратном буфере pH 3,2. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч, затем приливали 2 мл 5% раствора ТХУ и в надосадочной жидкости определяли прирост оптической плотности при 280 нм. Контролем служила та же проба с 10 мкг пепстатина. За единицу активности принимали такое количество катепсина D, которое увеличивает оптическую плотность в указанных условиях на 1 ед. при часовой инкубации. Пепстатин фирмы «Вапуо Со.» (Япония) был любезно предоставлен нам проф. Умегава. Синтез пепстатин-сефарозы проводили с помощью дициклогексилкарбодиимида и АН-сефарозы (фирма «Фармация»), как описано ранее [4].

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

Существенным моментом в обработке аорт является их измельчение до такой степени, чтобы можно было экстрагировать достаточные количества белка. Удовлетворительные в этом отношении результаты мы получили следующим образом. Замороженные аорты (в количестве 1 кг) разрезали пожом на небольшие куски и пропускали через электрическую мясорубку (типоразмер 764). Полученную массу заливали жидким азотом и снова пропускали через мясорубку. Измельченные таким образом аорты заливали 0,1 М фосфатным буфером pH 7 (в отношении 1 : 3) и оставляли в холодной комнате на 4 ч при перемешивании. После этого отделяли центрифугированием надосадочную жидкость (10 000 g, 20 мин, 4°C) и к ней добавляли сульфат аммония. Фракцию белков, выпадающую в осадок при 30—60% насы-

щении сульфата аммония, собирали при центрифугировании (10 000 g, 20 мин, 4°C). Осадок растворяли в 500 мл дистиллированной воды и ставили на диализ против 20 л дистиллированной воды в холодной комнате в течение 30 ч с двукратной сменой воды. Отдиализированный раствор подкисляли 0,1 М уксусной кислотой до pH 4,0, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (5000 g, 20 мин при комнатной температуре) и отбрасывали. Надосадочную жидкость наносили на колонку с пепстатин-сефарозой (3×8 см), предварительно уравновешенную 0,1 М цитратным буфером pH 4,0. Для удаления сорбированных на колонке балластных белков колонку промывали 0,1 М цитратным буфером pH 4,0, содержащим 0,5 М хлористый натрий. Элюцию катепсина D осуществляли 0,1 М бикарбонатным буфером pH 8,0, содержащим 0,5 М хлористый натрий. Раствор катепсина D диализовали в течение ночи против дистиллированной воды. Таким образом получали 50—100 мл раствора фермента с концентрацией белка порядка 0,02—0,05 мг/мл. Такой раствор концентрировали на аппарате «Амикон» с мембраной РМ-10 до объема 1—2 мл, замораживали и хранили при —20°C.

Количественные данные отдельных стадий очистки катепсина D представлены в таблице.

Очистка катепсина D из аорты свиней

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Фракция 30—60% насыщения сульфатом аммония	2000	80	0,04	1	100
Эликат с пепстатин-сефарозы	2,0	64	32	800	80

За исходный препарат в таблице взята белковая фракция, получаемая при осаждении сульфатом аммония (30—60% насыщения), так как протеолитическая активность исходного экстракта измельченной аорты низка и измеряется с низкой точностью. Таким образом, из 1 кг аорты получали 2 мг высокоактивного препарата катепсина D. При добавлении к 1 мл раствора выделенного катепсина (10—20 мкг фермента) 10 мкг пепстатина активность в отношении гидролиза гемоглобина полностью исчезала, в препарате не обнаруживали также активности по отношению к казеину при pH 6,5 и 8,0. Это позволяет сделать заключение, что в полученном препарате катепсина D нет заметных примесей других протеиназ.

Авторы благодарят акад. АМН СССР В. Н. Ореховича и проф. В. О. Шпикитера за ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карманский И. Н., Шпикитер В. О. — Бюлл. exper. биол., 1977, № 8, с. 173.
2. Kirk J. E., Enzymes of the Arterial Wall. New York, 1969.
3. Reich G., Buddecke E. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1967, Bd 348, S. 1616.
4. Казакова О. В., Орехович В. Н. — Биохимия, 1975, т. 40, с. 969.
5. Казакова В. О., Шуцкевер И. Е., Орехович В. Н. — Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 7 с. 887.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 256.
7. Anson M. L. — J. gen. Physiol., 1938, v. 22, p. 79.

Поступила 16/1 1979 г.

PURIFICATION OF CATHEPSIN D FROM PIG AORTA USING PEPSTATIN-SEPHAROSE

A. L. Pichugin, O. V. Kasakova

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

Affinity chromatography on pepstatin-Sepharose was used for isolation of cathepsin D from pig aorta. The enzyme was purified 800-fold. The proteolytic activity of cathepsin D was completely inhibited by pepstatin, suggesting that there were no other proteinases in the enzyme preparation obtained.

УДК 616-002.5-092.9-07:616.36-008.937-074

В. З. Горкин, Н. А. Елистратова

ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ БИОГЕННЫХ АМИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва, Московский
научно-исследовательский институт туберкулеза Министерства здравоохранения
РСФСР

Нарушению обмена биогенных аминов и других низкомолекулярных азотистых соединений принадлежит значительная роль в механизме развития многих патологических состояний [1]. Наиболее важную реакцию обмена аминов в организме, а именно реакцию окислительного дезаминирования, сопровождающуюся освобождением азота аминокруппы в виде аммиака, катализируют митохондриальные моноаминоксидазы (моноамин:кислород — оксидоредуктаза (дезаминирующая) (флавиносодержащая), КФ 1.4.3.4), функции которых существенно нарушаются при многих патологических состояниях. Установлено, что при заболеваниях, в патогенезе которых важное значение имеет усиление перекисного окисления липидов (лучевые поражения, отравление кислородом под высоким давлением), нарушения функций моноаминоксидаз не сводятся к снижению их активности, а сопровождаются качественным обратимым изменением (трансформацией) их каталитических свойств [2]. При такой трансформации моноаминоксидаз в опытах с высокоочищенными препаратами этих ферментов или с более сложными биологическими системами (например, митохондриальные фракции тканевых гомогенатов) появляются качественно новые свойства катализировать дезаминирование азотистых соединений, не относящихся к числу субстратов моноаминоксидаз (диамины, ω -аминокислоты, полиамины и др.). В результате трансформации моноаминоксидаз соотношение скоростей дезаминирования различных азотистых соединений в клетке существенно изменяется, что может иметь важное патогенетическое значение, например при заболеваниях, сопровождающихся усилением перекисного окисления липидов.

При туберкулезе легких были отмечены нарушения обмена липидов в организме, в частности в ткани печени [3]. Установлено также, что в организме больных туберкулезом легких нарушен обмен важных биогенных аминов (серотонина, гистамина) [4]. Возникло предположение о вероятной взаимосвязи этих нарушений. Целью настоящей работы была проверка этого предположения путем исследования перекисного окисления липидов и дезаминирования азотистых соединений в печени животных с экспериментальным туберкулезом.

Методика

В опытах были использованы белые разнополовые крысы массой тела 200—250 г. Деструктивный туберкулез легких у крыс вызывали путем внутрилегочного введения культуры микобактерий туберкулеза BOV-8 [5]. Через 24 дня после заражения

крыс декапитировали. Таким же способом забивали и контрольных животных. Из 10% гомогенатов ткани печени, приготовленных в 0,25 М водном растворе сахарозы, выделяли путем дифференциального центрифугирования [6] митохондриальные фракции. В полученных препаратах митохондриальных фракций (по 40 мг белка на пробу) после экстракции смесью гептан — изопропиловый спирт (1 : 1) определяли содержание сопряженных диенов полиненасыщенных жирных кислот спектрофотометрически по величине оптической плотности при 233 нм [7].

В этих же митохондриальных фракциях (по 10—15 мг белка на пробу) определяли содержание соединений преимущественно малонового диальдегида), реагирующих в кислой среде с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного (максимум поглощения при 532 нм) триметинового комплекса [8], а также измеряли скорость окислительного дезаминирования серотонина креатининсульфата (фирма «Реанал», Венгрия), тирамина солянокислого (фирма «Мерк», ФРГ), гистамина солянокислого (фирма «Ферак», ГДР), лизина солянокислого (фирма «Реанал», Венгрия) и путресцина солянокислого (фирмы «Кальбайокем», США) по осво-

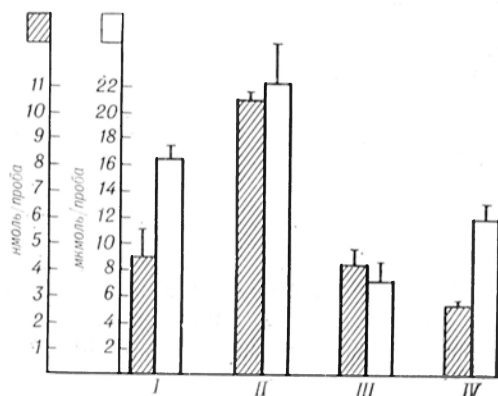


Рис. 1. Содержание диеновых конъюгатов (светлые столбики) и малонового диальдегида (темные столбики) в митохондриальных фракциях печени крыс.

I — контрольные животные (18); II — животные (12) с экспериментальным деструктивным туберкулезом легких (через 24 дня после заражения); III — животные (10) с туберкулезом, которым, начиная со 2-го дня после заражения, ежедневно в течение 21 дня вводили внутримышечно 1 раз в день тиосульфат натрия (0,05 г на 1 кг веса тела); IV — животные (8) с туберкулезом, которым, начиная со 2-го дня после заражения, ежедневно в течение 21 дня вводили перорально 1 раз в день изониазид в максимальной переносимой дозе (150 мг на 1 кг веса тела). Представлены средние арифметические величины \pm средние ошибки средних арифметических.

бождению аммиака [9]. Инкубационные пробы (общий объем 1,8 мл) при определении скорости дезаминирования содержали по 2—4 мг белка митохондриальных фракций, одно из исследуемых азотистых соединений в следующих оптимальных конечных концентрациях: серотонин 5 мМ, тирамин 3 мМ, гистамин, лизин, путресцин по 50 мМ, а также 0,1 М натрий-калий-фосфатный буфер pH 7,4. Указанные концентрации субстратов были выбраны на основании предварительных опытов; концентрации, превышавшие оптимальные, вызывали субстратное торможение, тогда как более низкие по сравнению с оптимальными концентрации не обеспечивали насыщение активных центров ферментов. Пробы инкубировали в атмосфере кислорода при 37°C в течение 30—50 мин. За это время реакции окислительного дезаминирования всех исследованных азотистых соединений протекали линейно в соответствии с уравнением реакций нулевого порядка. После окончания инкубации пробы фиксировали добавлением трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%), образующийся белковый осадок отделяли центрифугированием, а в надосадочной жидкости измеряли содержание аммиака методом изотермической диффузии Конвея и последующей нesslerизацией.

Содержание белка в пробах определяли при помощи метода, основанного на биуретовой реакции [10], используя в качестве стандарта раствор кристаллического бычьего сывороточного альбумина.

Результаты и обсуждение

В митохондриальных фракциях, изолированных из гомогенатов печени крыс с деструктивным туберкулезом легких, повышено статистически достоверно по сравнению с животными контрольной группы (рис. 1) содержание как сопряженных диенов полиненасыщенных жирных кислот (диеновых конъюгатов, образующихся на начальных этапах перекисного окисления липидов), так и реагирующих с образованием окрашенных комплексов с 2-тиобарбитуровой кислотой веществ, среди которых преобладает малоновый диальдегид — один из конечных продуктов перекисного окисления липидов [11]. Полученные результаты свидетельствуют об усилении процесса перекисного окисления липидов в митохондриальных фракциях из печени крыс с экспериментальным туберкулезом.

Введение таким животным через 2 дня после заражения гидразина изоникотиновой кислоты (изониазида), широко применяемого при лечении туберкулеза, предотвращало и устраняло развитие повышенного перекисного окисления липидов (см. рис. 1).

Если это действие изониазида определяется присущими ему свойствами нуклеофильного соединения, устраняющего, например, некоторые последствия стимуляции перекисного окисления липидов при экспериментальных поражениях [12], то можно было предполагать, что подобное действие окажет и другое нуклеофильное соединение — тиосульфат натрия, не применяемое в качестве специфического противотуберкулезного средства. Тиосульфат натрия относится к числу радиопрофилактических средств, снижающих интенсивность перекисного окисления липидов [13]. При экспериментальном атеросклерозе, характеризующемся усилением перекисного окисления липидов [14], тиосульфат натрия оказался эффективным средством экспериментальной терапии [15].

Проведенные нами опыты (см. рис. 1) подтвердили правильность сформулированного выше предположения: тиосульфат натрия действительно предотвращал или устранял наблюдаемое при экспериментальном туберкулезе усиление перекисного окисления липидов. Одновременное введение животным с экспериментальным туберкулезом легких изониазида и тиосульфата натрия не снижало содержания малонового диальдегида в митохондриальной фракции печени в большей мере, чем это имело место в группе крыс с деструктивным туберкулезом, которым вводили только изониазид. Содержание диеновых конъюгатов в митохондриальной фракции печени крыс с экспериментальным деструктивным туберкулезом легких при введении им изониазида в сочетании с тиосульфатом натрия было даже несколько выше, чем при введении таким животным изониазида. Такое явление, отмеченное и в митохондриальной фракции печени контрольных крыс, которым вводили тиосульфат натрия, можно объяснить свойством этого соединения прерывать цепь процессов перекисного окисления липидов на промежуточных этапах [11, 13].

Усиленное перекисное окисление липидов биомембран сопровождается нарушением структуры и функций мембрансвязанных ферментов [11]. Среди этих нарушений особенно важное значение обычно придают инактивации или, наоборот, чрезмерному усилению активности целого ряда ферментных систем [11]. Однако наряду с такими нарушениями в условиях стимуляции окисления липидов биомембран возможны также не только количественные, но и качественные изменения (трансформация) ферментативной активности, сопровождающиеся (помимо торможения или активации превращений, которые фермент катализировал при обычных «нормальных» условиях) проявлением новых, не присущих ферменту в норме каталитических свойств [2]. Подобные явления были обнаружены при изучении высокоочищенных моноаминоксидаз и структурно-связанных моноаминоксидаз печени или мозга при ряде патологических состояний, в патогенезе которых важное значение принадлежит стимуляции перекисного окисления липидов, например при лучевых поражениях, гипервитаминозе D, в печени животных-опухоленосителей [2], при экспериментальном отравлении кислородом под высоким давлением [16]. При этих патологических состояниях митохондриальные моноаминоксидазы наряду со снижением скорости дезаминирования жирно-ароматических моноаминов (тирамин, серотонин, дофамин и др.), являющихся обычными субстратами моноаминоксидаз в норме, приобретали не присущие им в норме свойства дезаминировать гистамин (типичный субстрат диаминоксидаз), диамины (путресцин, кадаверин), ω -аминокислоты (лизин, β -аланин, орнитин, γ -аминомасляная кислота), полиамины (спермин, спермидин) и даже нуклеотиды (адениловая кислота) [2, 12] или аминоксахара (глюкозамин, галактозамин) [16]. Эти имеющие важное патогенетическое значение качественные нарушения каталитических свойств моноаминоксидаз [2, 16] оказались (в противопо-

ложность простой инактивации моноаминоксидаз с обычным полным или частичным угнетением ферментативной активности) обратимыми и легко превращаемыми при помощи ряда химических соединений [2] процессами, что представляет особый интерес в связи с проблемами экспериментальной терапии подобных патологических состояний.

После обнаружения при экспериментальном деструктивном туберкулезе легких стимуляции перекисного окисления липидов в митохондриальной фракции печени крысы представляло интерес исследование возможной трансформации (качественного изменения) активности митохондриальных моноаминоксидаз печени. Если предположить, что это явление имеет место и при экспериментальном туберкулезе, то можно было ожидать, что в митохондриальной фракции печени крыс с деструктивным ту-

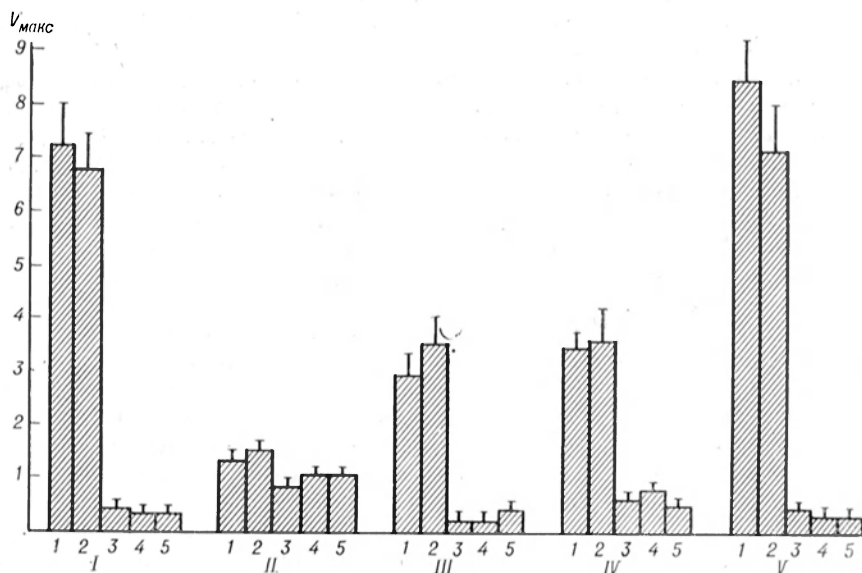


Рис. 2. Скорость V_{\max} ; в нмолях освобожденного аммиака за 1 мин на 1 мг белка) деаминарования серотонина (1), тирамина (2), гистамина (3), лизина (4) и путресцина (5) в митохондриальных фракциях печени крыс.

I—IV — см. подпись к рис. 1. V — животные (8) с туберкулезом, которым, начиная со 2-го дня после заражения, ежедневно в течение 21 дня вводили перорально изониазид (150 мг/кг) и внутримышечно тиосульфат натрия (0,05 г/кг).

беркулезом легких, когда перекисное окисление липидов существенно усилено (рис. 1), будет отмечено не только торможение скорости деаминарования типичных субстратов митохондриальных моноаминоксидаз (серотонина, тирамина), но одновременно произойдет усиление (или появление) деаминарования азотистых соединений, не относящихся к числу субстратов моноаминоксидаз, но деаминируемых трансформированными моноаминоксидазами (гистамин, лизин, путресцин).

Результаты опытов полностью подтвердили (рис. 2) наше предположение: при деструктивном туберкулезе легких по сравнению с нормой в митохондриальной фракции печени статистически достоверно снижалась ($P < 0,001$) скорость деаминарования серотонина и тирамина при одновременном нарастании ($P < 0,01$) скорости деаминарования гистамина, лизина и путресцина. Так, скорость деаминарования лизина, которая в митохондриальной фракции печени контрольных крыс была крайне низкой — $0,3 \pm 0,1$ нмоль аммиака за 1 мин на 1 мг белка (примерно 5% по сравнению со скоростью деаминарования субстратов моноаминоксидаз), при экспериментальном туберкулезе возрастала до $1,0 \pm 0,08$ нмоль аммиака за 1 мин на 1 мг белка, что составляет примерно 70% по сравнению со скоростью

дезаминирования биогенных моноаминов серотонина и тирамина в этом же биологическом объекте.

Если обнаруженные нарушения соотношений скоростей дезаминирования азотистых соединений в митохондриальной фракции печени при экспериментальном туберкулезе легких действительно обусловлены качественным изменением (трансформацией) каталитических свойств моноаминоксидаз, то на основании уже имеющихся сведений об этом процессе [2] можно предполагать, что такие нарушения должны быть обратимыми и легко предотвращаемыми. Действительно, как следует из рис. 2, при введении животным с экспериментальным туберкулезом легких изониазида на 2-й день после заражения статистически достоверно (по сравнению с зараженными крысами, которым не вводили изониазид), повышалась скорость дезаминирования серотонина ($P < 0,001$) и тирамина ($P < 0,05$) и одновременно уменьшалась скорость дезаминирования гистамина, лизина или путресцина ($P < 0,05$). Эти эффекты удавалось воспроизвести введением зараженным крысам вместо изониазида тиосульфата натрия, который также обладал свойством повышать скорость дезаминирования серотонина или тирамина ($P < 0,01$), одновременно снижая скорость дезаминирования путресцина ($P < 0,01$), а также в еще большей мере гистамина или лизина ($P < 0,001$). Полной нормализации соотношений скоростей дезаминирования азотистых соединений в митохондриальной фракции печени крыс с экспериментальным деструктивным легочным туберкулезом удавалось достичь путем одновременного введения таким животным изониазида и тиосульфата натрия (см. рис. 2).

Согласно полученным ранее данным [2, 16], трансформация моноаминоксидаз, сопровождающая усиление перекисного окисления липидов биомембран при патологических состояниях, начинается с частичного, обратимого окисления тиоловых групп моноаминоксидаз типа А до остатков цистеинсульфеновой кислоты. По-видимому, тиосульфат натрия, прерывая цепь процессов перекисного окисления липидов [13], способствует в основном предотвращению трансформации моноаминоксидаз, тогда как изониазид (преимущественно в качестве восстановителя) способен также устранять последствия уже инициированного процесса качественного модифицирования моноаминоксидаз подобно тому, как это наблюдалось при экспериментальных лучевых поражениях [12].

Наше предположение о том, что при туберкулезе моноаминоксидазы в организме подвергаются обратимому, качественному модифицированию (трансформации) каталитической активности согласуется с результатами клинических наблюдений о нарастании в крови уровня серотонина при относительном снижении содержания гистамина в случаях торпидного малосимптомного туберкулеза с преобладанием продуктивных изменений в легочной ткани [4].

В этой связи представляет интерес свойство трансформированных моноаминоксидаз дезаминировать богатые лизином гистоны [2] и свободный лизин с отщеплением именно ϵ -аминогруппы [17], что является необходимым этапом при образовании десмозина, изодесмозина, лизинонорлейцина в процессе возникновения поперечных связей в соединительнотканых белках. По современным представлениям [18], в норме этот процесс осуществляется при участии фермента лизилоксидазы. Но при патологических состояниях, сопровождающихся, как это имеет место и при туберкулезе, усилением перекисного окисления липидов в биомембранах, следствием чего является не только разрушение тканевых структур, но также, в частности, качественное изменение (трансформация) свойств моноаминоксидаз, в развитие аномальных продуктивных изменений соединительной ткани могли бы вмешиваться и трансформированные моноаминоксидазы. Если это предположение правильно, то химические соединения, предотвращающие и (или) устраняющие трансформацию моноаминоксидаз, должны способствовать предотвращению или устранению продуктивных изменений

в соединительной ткани при туберкулезе. Клинические наблюдения о действии тиосульфата натрия на развитие соединительной ткани в организме согласуются с нашим предположением [19]. Интересно отметить также, что β -аминопропионитрил, избирательно тормозящий катализируемое трансформированными моноаминоксидазами отщепление ϵ -аминогруппы лизина [17], был использован в клинике [20] при склеродермии как средство, тормозящее образование поперечных связей в коллагеновых белках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орехович В. Н., Горкин В. З. — Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1976, № 2, с. 122.
2. Горкин В. З. — Молекулярная биол., 1976, № 4, с. 717.
3. Давыдовский И. В. Общая патология человека. Изд. 2-е. М., 1969, с. 106.
4. Гурьева И. Г., Андреев Н. И. — В кн.: Значение фиброза в современной фтизиатрии. М., 1976, с. 27.
5. Бондарев И. М., Клебанова А. А. и др. — Пробл. туб., 1966, № 9, с. 53.
6. Schneider W. C. — J. biol. Chem., 1948, v. 176, p. 259.
7. Стальная И. Д. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 63.
8. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. — Там же, с. 66.
9. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гриднева Л. И. и др. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1968, т. 2, с. 155.
10. Делекторская Л. Н., Сентебова Н. А., Салуэнья А. И. — Лабор. дело, 1971, № 8, с. 483.
11. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972, с. 236.
12. Акопян Ж. И., Кулыгина А. А., Терзезман И. И. и др. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 289, p. 44.
13. Журавлев А. И., Тарусов Б. Н. — Радиобиология, 1962, № 2, с. 177.
14. Воскресенский О. Н. — Вопр. мед. химии, 1973, № 1, с. 87.
15. Кононенко В. Я., Балькина Е. М., Давиденко Л. М. — В кн.: Вопросы эндокринологии и обмена веществ. Киев, 1970, вып. 1, с. 104.
16. Горошинская И. А., Броневицкая Э. Г., Горкин В. З. — Commun. Psychopharmacol., 1977, v. 1, p. 39.
17. Горкин В. З., Акопян Ж. И. — Experientia (Basel), 1968, v. 24, p. 1115.
18. Мазуров В. И. Биохимия коллагеновых белков. М., 1974, с. 78.
19. Муканов У. М. — Здравоохр. Казахстана, 1974, № 6, с. 70.
20. Keiser H. R., Sjoerdsma A. — Clin. Pharm. Ther., 1967, v. 8, p. 593.

Поступила 16/1 1979 г.

DEAMINATION OF BIOGENIC AMINES IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS

V. Z. Gorkin, N. A. Yelistratova

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Tuberculosis, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

Stimulation of lipid peroxidation /increase in content of conjugated dienes and of malone dialdehyde/, which was prevented by administration of isoniazid or sodium thiosulphate, was detected in mitochondrial fraction of liver tissue obtained from rats with tuberculosis of lungs. At the same time, in the mitochondrial fraction a significant decrease in tyramine and serotonin deamination rates and an increase in histamine, lysine and putrescine deamination rates were observed. The altered ratio of the deamination rates of the nitrogenous compounds may be prevented by administration of isoniazid and sodium thiosulphate into the animals. A hypothesis is discussed on the possible significance of qualitative alteration /transformation/ in catalytic properties of the mitochondrial monoamine oxidase induced by the stimulation of lipid peroxidation as a cause underlying the reversible impairments in ratios of rates of the nitrogenous compounds deamination in tuberculosis.

В. В. Моррисон

К МЕХАНИЗМУ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И ЭЛЕКТРОЛИТНОГО ОБМЕНА В ДЫХАТЕЛЬНОЙ МУСКУЛАТУРЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БОТУЛИЗМЕ

Кафедра патологической физиологии им. А. А. Богомольца Саратовского медицин-
ского института

Ведущим симптомом ботулинического поражения является развитие паралича скелетной мускулатуры в результате воздействия ботулизма на моторные нейроны спинного мозга [1, 2] и блокирования выброса передатчика в мионевральных синапсах [3, 4 и др.]. Нередко объектом патогенного действия токсина является дыхательная мускулатура. В этом случае у людей и экспериментальных животных развивается асфиксический синдром, являющийся непосредственной причиной смерти [5—7].

В плане дальнейшего изучения патогенеза ботулизма представляло интерес изучить нарушения энергетического и ионного обмена в дыхательной мускулатуре в динамике ботулинической интоксикации.

М е т о д и к а

Опыты проведены на кошках обоего пола массой 2,5—3 кг. Генерализованную ботулиническую интоксикацию вызывали внутривенным введением токсина ботулизма типа С (1 ДЛМ для мыши — 0,0006 мг сухого токсина) из расчета 1 мг/кг. Исследования проводили через 1 сут при развитии парезов мышц и через 3 сут на фоне генерализованного паралитического синдрома. Для получения местной формы интоксикации ботулинический токсин вводили в дозе 0,15 мг/кг односторонне в межреберные мышцы и диафрагму; через 1 сут развивался паралич лишь указанных мышц. Исследования проводили в ранней (4 сут) и поздней (14 сут) стадиях ботулинической интоксикации. Животных наркотизировали этаминалом натрия (35 мг/кг внутривенно).

Содержание ионов калия и натрия в тканях определяли методом пламенной фотометрии [8], гликоген — антроновым методом [9], креатинфосфат — по креатинину колориметрически с пикриновой кислотой [10].

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

Как видно из табл. 1, через 1 сут после внутривенного введения токсина ботулизма на фоне парезов скелетной мускулатуры концентрация гликогена и креатинфосфата в межреберных мышцах снижалась, а в диафрагме не отличалась от контроля. Более выраженные изменения были обнаружены в поздней стадии ботулинической интоксикации при развитии генерализованных параличей и тяжелой дыхательной недостаточности. Так, через 3 сут после введения токсина нарушение нервно-мышечной передачи сопровождалось снижением концентрации креатинфосфата в дыхательной мускулатуре, особенно в межреберных мышцах; уровень гликогена при этом не претерпевал изменений.

Нарушения содержания макроэргических субстанций в дыхательной мускулатуре при развитии ботулинических параличей и асфиксического синдрома сочетались с выраженными изменениями ионного баланса. Через 3 сут после введения яда в диафрагме и межреберных мышцах концентрация ионов калия снижалась, а содержание ионов натрия оставалось неизменным (табл. 2).

Таким образом, при генерализованной ботулинической интоксикации наблюдались значительные нарушения ионного баланса и содержания креатинфосфата в различных дыхательных мышцах. Эти изменения, видимо, имеют сложный генез и могут быть связаны как с патогенным действием гипоксического фактора, так и с блокадой нервно-мышечной передачи.

Чтобы выяснить этот вопрос, мы и провели эксперименты по определению электролитов, креатинфосфата и гликогена при местной ботулинической интоксикации, при которой асфиксический синдром не развивался.

Таблица 1

Изменение содержания гликогена (в мкмоль глюкозы на 1 г ткани) и креатинфосфата (в мкмоль креатинина на 1 г ткани) в дыхательных мышцах при экспериментальной ботулинической интоксикации

Условия опыта	Диафрагма				Межреберные мышцы			
	гликоген		креатинфосфат		гликоген		креатинфосфат	
	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n
Контроль	$26,5 \pm 3,7$	10	$12,9 \pm 2,24$	10	$24,1 \pm 3,51$	10	$13,3 \pm 1,35$	9
Ботулизм генерализованный:								
1 сут	$25,3 \pm 2,96$	12	$12,6 \pm 1,18$	12	$14,2 \pm 1,36$	11	$10,5 \pm 0,71$	11
P	$>0,5$		$>0,5$		$<0,05$		$>0,05$	
3 сут	$29,0 \pm 3,39$	19	$10,2 \pm 1,06$	8	$23,4 \pm 2,59$	10	$8,6 \pm 0,8$	9
P	$>0,5$		$>0,2$		$>0,5$		$<0,01$	
3 сут + гуанидин	$48,1 \pm 7,4$	10	$11,7 \pm 1,94$	10	$48,1 \pm 8,14$	10	$10,1 \pm 1,53$	10
P	$<0,05$		$>0,5$		$<0,02$		$>0,1$	
P_1	$<0,05$		$>0,5$		$<0,01$		$>0,5$	
Ботулизм местный:								
4 сут	$21,0 \pm 4,38$	8	$11,0 \pm 0,8$	8	$18,5 \pm 2,77$	8	$10,3 \pm 1,23$	8
P	$>0,2$		$>0,5$		$>0,5$		$>0,1$	
14 сут	$12,9 \pm 1,66$	8	$6,4 \pm 0,72$	8	$17,3 \pm 1,23$	8	$6,8 \pm 0,95$	8
P	$<0,01$		$<0,02$		$>0,05$		$<0,01$	

Примечание. Здесь и в табл. 2: P — достоверность разницы с контролем; P_1 — достоверность разницы с той же стадией интоксикации без применения препарата.

Таблица 2

Изменение концентрации ионов калия и натрия (в ммоль на 1 г сухой ткани) в дыхательных мышцах при экспериментальной ботулинической интоксикации

Условия опыта	Диафрагма				Межреберные мышцы			
	калий		натрий		калий		натрий	
	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n
Контроль	$0,437 \pm 0,02$	17	$0,097 \pm 0,007$	15	$0,434 \pm 0,015$	19	$0,103 \pm 0,006$	19
Ботулизм генерализованный:								
3 сут	$0,314 \pm 0,013$	8	$0,084 \pm 0,007$	8	$0,353 \pm 0,021$	8	$0,095 \pm 0,006$	8
P	$<0,001$		$>0,2$		$<0,01$		$>0,2$	
3 сут + гуанидин	$0,355 \pm 0,029$	8	$0,111 \pm 0,005$	10	$0,394 \pm 0,032$	9	$0,06 \pm 0,005$	9
P	$<0,01$		$>0,2$		$>0,2$		$<0,001$	
P_1	$>0,2$		$>0,1$		$>0,5$		$<0,01$	
Ботулизм местный:								
4 сут	$0,404 \pm 0,013$	17	$0,091 \pm 0,006$	15	$0,411 \pm 0,019$	16	$0,081 \pm 0,006$	19
P	$>0,1$		$>0,5$		$>0,2$		$<0,02$	
14 сут	$0,372 \pm 0,008$	15	$0,143 \pm 0,014$	16	$0,388 \pm 0,014$	16	$0,127 \pm 0,008$	16
P	$<0,01$		$<0,01$		$<0,05$		$<0,05$	

Как видно из табл. 1 и 2, на ранней стадии местного ботулизма (4 сут после введения токсина) на фоне развившегося паралича как в диафрагме, так и в межреберных мышцах несколько снижалась концентрация креатинфосфата и гликогена. Это сочеталось с незначительным уменьшением содер-

жения в мышцах иона калия. Более выраженные изменения были обнаружены на поздней стадии местной ботулинической интоксикации. Через 14 сут после введения токсина наблюдалось выраженное снижение концентрации макроэргических субстанций в различных дыхательных мышцах. Отмечалось также уменьшение содержания калия и увеличение концентрации натрия в диафрагме и межреберных мышцах.

Учитывая, что токсин при локальном ботулизме из места инокуляции может по нервным стволам проникать в спинной мозг [11, 12], мы изучили ионный состав не только дыхательных мышц, но и соответствующих им сегментов спинного мозга. Как показали исследования, в нервной ткани не возникло нарушений электролитного баланса даже на поздних стадиях местной ботулинической интоксикации.

Таким образом, наблюдающиеся при локальном ботулиническом параличе изменения ионного баланса и концентрации резервного макроэрга креатинфосфата в дыхательной мускулатуре во многом сходные с таковыми при генерализованной форме интоксикации, но неидентичные им. Кроме того, при местном ботулизме в отличие от общей формы интоксикации обнаружен выраженный дефицит гликогена в дыхательных мышцах.

Известно, что гуанидина гидрохлорид способен уменьшать нервно-мышечный блок, вызванный токсином ботулизма, облегчающим выброс передатчика с пресинаптической мембраны холинергических синапсов [13—15]. На основании экспериментов с введением животным с генерализованной формой интоксикации гуанидина гидрохлорида (ежедневно по 50 мг/кг внутривенно) мы установили, что препарат частично восстанавливает содержание ионов калия и креатинфосфата в мышцах, уменьшает концентрацию ионов натрия в межреберных мышцах и вызывает заметное повышение концентрации гликогена в дыхательной мускулатуре. Таким образом, применение гуанидина гидрохлорида при экспериментальной ботулинической интоксикации, сопровождающейся тяжелой дыхательной недостаточностью, частично нормализует ионный баланс и содержание креатинфосфата в скелетной мускулатуре животных.

Полученные данные позволяют заключить, что происходящие при ботулинической интоксикации изменения имеют сложный генез и связаны как с блокадой синаптической передачи, так и с развивающимся асфиксическим синдромом. Частичная же нормализация уровня креатинфосфата и электролитов при генерализованном ботулизме, видимо, свидетельствует об обратимости нарушения обмена веществ даже на поздних стадиях общей ботулинической интоксикации.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Михайлов В. В., Королев В. В. — Бюлл. exper. биол., 1968, № 11, с. 24—27.
2. Михайлов В. В., Михайлов В. Вас. — Там же, 1975, № 11, с. 21—24.
3. Brooks V. B. — J. Physiol. (Lond.), 1956, v. 134, p. 264—273.
4. Thesleff S. — Ibid., 1960, v. 151, p. 598—607.
5. Маслов О. К., Попов Б. П., Салимов С. Г. — Сов. мед., 1963, № 6, с. 139.
6. Попова Л. М. — Клин. мед., 1964, № 2, с. 83—87.
7. Попова Л. М. — Там же, 1969, № 9, с. 89—98.
8. Берхин Е. Б., Иванов Ю. И. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена. Барнаул, 1972.
9. Seifter S., Dayton S., Novic B. et al. — Arch. Biochem., 1950, v. 25, p. 191—197.
10. Алексеева А. М. — Биохимия, 1956, № 2, с. 243—246.
11. Haberman E. — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1974, Bd 281, S. 47—56.
12. Wiegand H., Erdmann G., Wellhoner H. M. — Ibid., 1976, Bd 292, S. 161—165.
13. Cherington M., Ryan D. W. — New Engl. J. Med., 1970, v. 282, p. 195—197.
14. Kamenskaya M. A., Elmquist D., Thesleff S. — Arch. Neurol. (Chic.), 1975, v. 32, p. 505—510.
15. Otsuka M., Endo M. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1960, v. 128, p. 273—282.

Поступила 19/1 1979 г.

ON THE MECHANISM OF ALTERATIONS IN ENERGY AND ELECTROLYTE METABOLISM OF RESPIRATORY MUSCLES IN EXPERIMENTAL BOTULISM

V. V. Morrison

Medical School, Saratov

Distinct decrease in concentrations of creatine phosphate and K^+ was observed in various respiratory muscles of cat in generalized botulism, accompanied by the syndrome of asphyxia. Content of glycogen and Na^+ was unaltered in these cases. In local botulinic paralysis concentrations of creatine phosphate, glycogen and K^+ were decreased in the respiratory muscles. Accumulation of Na^+ was observed in diaphragm and intercostal muscles. Content of K^+ and creatine phosphate was partially restored in respiratory muscles after intraperitoneal administration of guanidine. HCl/50 mg/kg of body weight/.

УДК 612.351.11+616.36-006-092.9-008.931

С. Я. Давыдова

СОПОСТАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ И НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ В ГОМОГЕНАТАХ И ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ НОРМАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ, ГЕПАТОМАХ И ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ С ПРИВИТЫМИ ГЕПАТОМАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Лаборатория биохимии опухолей Онкологического научного центра АМН СССР, Москва

Известно, что 5'-нуклеотидаза, локализуясь преимущественно в наружных, плазматических клеточных мембранах (ПМ), является для них маркером. Одним из показателей чистоты изолированных ПМ является степень их обогащения 5'-нуклеотидазой по отношению к исходному гомогенату ткани. Однако значение этого фермента не исчерпывается ролью маркера. В ряде работ [1, 2] было отмечено значительное снижение активности этого фермента в ПМ асцитных гепатом и гомогенатах опухолей. Обнаружено снижение, а иногда и отсутствие активности 5'-нуклеотидазы в опухолях грудной железы, причем снижение активности фермента совпадало с повышением способности опухоли к метастазированию [3]. В регенерирующей печени активность этого фермента не изменялась [2].

Мы сопоставили активность 5'-нуклеотидазы в ПМ нормальной печени, печени мышей с привитыми гепатомами различной степени злокачественности и в самих гепатомах, а также в условиях воздействия различных субстратов и при изменении pH.

Методика

Опыты проводили на мышах линии СЗНА с перевиваемыми гепатомами Гельштейн различной степени злокачественности [4]. По темпу роста и степени злокачественности исследованные опухоли делятся на быстрорастущие, высокозлокачественные (гепатома 22, плотная и асцитная формы) и низкокзлокачественные (гепатомы 49 и 46). Хотя гепатомы 49 и 46 являются малозлокачественными, между ними существуют различия. Гепатома 49 растет медленнее гепатомы 46, ее клетки сохраняют морфологическое сходство с гепатоцитами. ПМ выделяли по методу [5] в модификации [6] в среде, содержащей 1 мМ $NaHCO_3$ и 0,5 мМ $CaCl_2$ (при выделении ПМ из асцитной гепатомы концентрацию $CaCl_2$ увеличивали до 2 мМ), с последующим ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Собирали фракцию ПМ, флотирующую в интервале между плотностями сахарозы 1,16 и 1,18. Фракции гомогената получали после 100-кратного разбавления гомогенизированной ткани средой выделения. Активность 5'-нуклеотидазы определяли по методу [7] в 0,25 М трис-HCl-буфере pH 8,5 или 7,4 с субстратами АМФ или цитидинмонофосфат (ЦМФ) по высвобождению неорганического фосфата.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные об изменении активности 5'-нуклеотидазы в ПМ гепатом по мере усиления их злокачественности. Активность фермента в ПМ самой медленно растущей гепатомы 49 снижается незначительно. В гепатоме 46 она уже снижается почти в $2\frac{1}{2}$ раза, но особенно резко это снижение выражено в плотной и асцитной высокозлокачественных гепатомах 22. В ПМ этих гепатом по сравнению с ПМ нормальной печени активность 5'-нуклеотидазы снижается более чем в 6 раз. Активность фермента снижается также в печени мышей с опухолями, однако незначительно (на 20—30%). В гомогенатах тканей это снижение затрагивает только ПМ гепатомы 22 (табл. 2). Эти экспериментальные результаты приобретают интерес при сопоставлении с клиническими наблюдениями. Было показано, что в лимфоцитах, выделенных из крови людей, больных лимфолейкозом, активность 5'-нуклеотидазы значительно ниже, чем у здоровых, и часто даже не определяется [8]. Изменение активности 5'-нуклеотидазы и ряда других ферментов рекомендуется использовать в качестве теста при исследовании развития опухоли печени [9].

Таблица 1
Активность 5'-нуклеотидазы в ПМ клеток нормальной печени, гепатом и печени мышей с опухолью (в мкг неорганического фосфата на 1 мг белка ПМ)

Животные	Печень	Гепатома
Контрольные (норма)	34,0±3,5	—
С гепатомой 49	26,3±3,9	26,3±2,1
» » 46	25,1±3,0	14,2±1,7
» » 22 (плотная)	22,4±2,5	6,3±0,5
» » 22 (асцитная)	25,8±2,8	5,1±0,4

Таблица 2
Активность 5'-нуклеотидазы в гомогенатах нормальной печени, гепатом и печени мышей с опухолью в зависимости от субстрата и рН (в мкг неорганического фосфата на 1 мг белка гомогената)

Исследованные животные	АМФ		ЦМФ		АМФ+ЦМФ	
	рН 8,5	рН 7,4	рН 8,5	рН 7,4	рН 8,5	рН 7,4
Контрольные (норма): печень	4,0±0,7	4,1±0,8	3,3±0,7	2,6±0,5	3,3±0,6	4,5±1,0
С гепатомой 46: гепатома	4,3±1,1	3,4±0,8	3,3±0,8	2,9±0,6	3,6±0,8	3,4±0,7
печень	4,4±0,7	3,5±0,7	4,1±1,0	3,7±0,7	5,1±1,5	3,8±0,8
С гепатомой 22 (плотная форма): гепатома	2,1±0,4	1,1±0,2	1,1±0,3	0,5±0,1	4,5±1,0	2,7±0,4
печень	4,1±0,7	2,3±0,4	1,9±0,3	1,9±0,3	5,4±1,2	4,3±1,9

Возможно, что 5'-нуклеотидаза не является гомогенным ферментом и имеет изоимы, различающиеся субстратной специфичностью, оптимумом рН и др. Некоторые основания для такого суждения приведены в работе [10], где показаны различия в свойствах 5'-нуклеотидазы в зависимости от локализации ее в ПМ или в гомогенате тканей.

Мы исследовали активность 5'-нуклеотидазы в гомогенатах и ПМ нормальной печени, гепатом и печени мышей с опухолью, учитывая субстрат и величину рН. Определяли активность фермента в оптимальных для него значениях рН 8,5 и при рН 7,4, сопоставляли активность при воздействии субстратов АМФ и ЦМФ, а также обоих их одновременно. Полученные результаты суммированы в табл. 2 и 3.

В гомогенатах и ПМ нормальной печени не было обнаружено изменений активности фермента при переходе рН от 8,5 к 7,4. При субстрате ЦМФ в гомогенате и ПМ активность была ниже, чем с субстратом АМФ.

Суммирование действия АМФ и ЦМФ не было отмечено. У мышей с привитой гепатомой 46 в гомогенатах и ПМ гепатом и печени активность 5'-нуклеотидазы была оптимальной при рН 8,5 и субстрате АМФ. Суммирования действия обоих субстратов не обнаружено. У мышей с высокозлокачественной гепатомой 22 резко снижалась активность 5'-нуклеотидазы в гомогенатах гепатомы и печени при рН 7,4 и при субстрате ЦМФ. Так, активность фермента при ЦМФ и рН 7,4 в гомогенате гепатомы составляла лишь 25% от активности, определявшейся при рН 8,5 и наличии АМФ. Наблюдалось также суммирование эффекта обоих субстратов (см. табл. 2). Такое же направление изменений было и в ПМ печени мышей с привитой гепатомой 22, но они были менее выражены. Однако в ПМ гепатомы 22 активность 5'-нуклеотидазы при рН 7,4 и с субстратом ЦМФ резко снижалась.

Т а б л и ц а 3

Активность 5'-нуклеотидазы в ПМ клеток нормальной печени, гепатом и печени мышей с опухолью в зависимости от субстрата и рН (в мкг неорганического фосфата на 1 мг белка ПМ)

Исследованные животные	АМФ		ЦМФ		АМФ + ЦМФ	
	рН 8,5	рН 7,4	рН 8,5	рН 7,4	рН 8,5	рН 7,4
Контрольные (норма):						
печень	34,0±3,5	34,8±3,5	24,6±2,2	25,9±2,3	29,9±3,0	28,8±2,5
С гепатомой 46:						
печень	25,1±3,0	21,9±3,0	20,4±2,8	13,1±1,5	16,9±2,1	16,9±2,1
гепатома	26,3±3,9	19,2±2,1	15,4±2,0	13,4±1,5	29,3±3,0	23,1±2,5
С гепатомой 22:						
печень	22,4±2,5	20,0±2,1	18,6±1,9	15,9±2,0	36,6±3,1	35,5±3,2
гепатома	6,3±0,5	3,7±0,4	2,9±0,3	2,9±0,2	5,9±0,4	5,2±0,4

Наши данные относительно поведения 5'-нуклеотидазы в ПМ нормальной печени совпадают с результатами других исследователей [10], которые не нашли субстратной специфичности для ПМ печени.

Особенности в проявлении оптимальной активности 5'-нуклеотидазы в высокозлокачественной гепатоме 22, возможно, свидетельствуют о том, что в этой гепатоме имеется один из изоформ 5'-нуклеотидазы, обладающий выраженной субстратной специфичностью и оптимумом рН.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Emmelot P., Bos C. J. — Int. J. Cancer, 1969, v. 4, p. 705—722.
2. Ikehara J., Takahashi K., Marsho K. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 470, p. 202—211.
3. Kim J., Baumler A., Carruthers Ch. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 1975, v. 72, p. 1012—1016.
4. Гельштейн В. Н. — Цитология, 1971, № 1, с. 3—12.
5. Neville D. M. — J. biophys. biochem. Cytol., 1960, v. 8, p. 413.
6. Emmelot P., Bos C. J. et al. — Biochem. biophys. Acta, 1964, v. 90, p. 126.
7. Heppel L. A., Hilmo R. I. — J. Biol. Chem., 1951, v. 188, p. 665.
8. Silber R., Conklyn M., Grusky G. et al. — J. clin. Invest., 1975, v. 56, p. 1324—1327.
9. Gökse V., Gökse M. — Arch. Un. méd. balk., 1974, v. 12, p. 374—378.
10. Solyom A., Trams E. G. — Enzyme, 1972, v. 13, p. 329—372.

Поступила 19/1 1979 г.

COMPARISON OF ACTIVITY AND SOME PROPERTIES OF 5'-NUCLEOTIDASE FROM HOMOGENATES AND PLASMATIC MEMBRANES OF NORMAL LIVER TISSUE, FROM HEPATOMAS AND LIVER TISSUE OF MICE WITH HEPATOMAS OF VARIOUS MALIGNANCY

S. Ya. Davydova

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

Activity of 5'-nucleotidase was significantly lower in plasmatic membranes of highly malignant hepatoma 22 as compared with the activity found in normal liver tissue. The

optimal activity of the enzyme from hepatoma 22 was found at pH 8.5 with AMP as a substrate. Decrease of pH value from 8.5 to 7.4 did not affect the enzymatic activity in homogenates and plasmatic membranes in the normal liver tissue. In all the experiments activity of 5'-nucleotidase was lower towards CMP as compared with AMP. The additive effect of the both substrates was observed only in experiments with hepatoma 22.

УДК 616.33-002.44-07:[616.153.484.23+ 616.633.484.23]-07

П. Д. Рабинович, П. В. Милушкин

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ МЕТАБОЛИТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ В КРОВИ И МОЧЕ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Кафедра факультетской терапии педиатрического факультета Саратовского медицинского института, кафедра госпитальной терапии Читинского медицинского института

Местный механизм образования язв при язвенной болезни изучен недостаточно. Ряд гастроэнтерологов считают, что они образуются вследствие снижения резистентности слизистой оболочки гастродуоденальной системы [1]. Одной из причин ослабления защитного барьера последней может быть нарушение биологического окисления [2].

Данные литературы о состоянии тканевого дыхания при язвенной болезни противоречивы. Одни авторы [3—5] отмечают угнетение окислительно-восстановительных процессов у больных язвенной болезнью, другие [6, 7] — их усиление. Противоречивы сведения о содержании в крови больных язвенной болезнью метаболитов пировиноградной и молочной кислот [8—10], отсутствуют данные о концентрации уксусной, щавелевоуксусной и лимонной кислот при язвенной болезни.

Цель настоящей работы — изучить состояние биологического окисления при язвенной болезни, о чем судили по балансу метаболитов, образующихся на 3 его этапах — гликолиза, окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты и включения активированного ацетата в цикл Кребса. Об интенсивности гликолиза судили по количеству пировиноградной и молочной кислот. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты оценивали по балансу этих кислот в сопоставлении с содержанием в крови уксусной кислоты. Скорость включения последней в цикл Кребса определяли по концентрации лимонной и щавелевоуксусной кислот в крови. Результаты наблюдений у больных сравнивали с данными, полученными у здоровых людей, а для установления специфичности нарушений — с отклонениями, выявленными у пациентов, страдающих хроническим гастритом и раком желудка.

М е т о д и к а

Содержание пировиноградной кислоты в крови и моче определяли 2,4-динитрофенилгидразиновым методом [11]. Дебит пировиноградной кислоты в моче подсчитывали за 12 ночных часов. Концентрацию молочной кислоты в крови измеряли гидрохиноновым методом [12]. Количество лимонной кислоты в сыворотке крови определяли по методу [13] в модификации [14]. Содержание щавелевоуксусной кислоты в крови измеряли по методу [15] с солянокислым гидразином. Количество уксусной кислоты в крови определяли с метанолом, отделяя метиловый эфир уксусной кислоты последовательной перегонкой, по методике [16]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

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

Обследовали 123 больных язвенной болезнью гастродуоденальной системы в возрасте от 17 до 59 лет. У 77 из них (54 мужчины и 23 женщины) язва локализовалась в пилородуоденальной зоне, у 48 (31 мужчины и 17 женщин) — в теле желудка. Контрольную группу составляли 68 здоровых людей в возрасте от 18 до 62 лет (45 мужчин и 23 женщины), 31 боль-

Содержание пировиноградной, молочной, лимонной, уксусной и шавелево-уксусной кислот в крови и пировиноградной кислоты в моче при заболеваниях органов пищеварения

Обследованные	Пировиноградная кислота			Молочная кислота		Лимонная кислота		Уксусная кислота		Шавелевоуксусная кислота	
	п	в крови, мг %	в моче, мг/12 ч	п	мг %	п	мг %	п	мг %	п	мг %
Больные язвенной болезнью с локализацией язвы: в пилородуоденальной зоне: обострение улучшение состояния в теле желудка: обострение улучшение состояния Больные хроническим гастритом в периоде обострения Больные раком желудка	62	2,4±0,4	26,8±2,7	62	19,5±1,0	62	1,6±0,1	15	1,2±1,1	41	0,7±0,2
	62	1,3±0,2	16,8±2,1	62	12,5±1,2	62	2,5±0,3	—	—	41	0,9±0,1
	38	2,6±0,3	29,4±0,7	38	20,4±2,3	38	1,5±0,2	10	12,0±1,5	24	0,7±0,2
	38	1,4±0,2	17,3±1,0	38	14,1±2,1	38	1,9±0,1	—	—	24	0,6±0,3
	31	2,8±0,6	32,1±7,2	31	26,1±4,2	31	2,7±0,4	—	—	—	—
	36	3,6±0,2	37,6±5,2	36	32,0±3,2	36	3,0±0,2	—	—	—	—
Здоровые люди	46	1,2±0,3	15,2±1,6	46	12,1±1,5	46	2,1±0,2	22	15,6±0,9	36	0,8±0,2

ной хроническим гастритом в возрасте от 19 до 60 лет (22 мужчины и 9 женщин) и 36 больных раком желудка в возрасте от 36 до 64 лет (26 мужчин и 10 женщин).

Из таблицы видно, что в период обострения язвенной болезни концентрация пировиноградной кислоты в крови была выше нормы: при язве пилородуоденальной зоны в 2 раза ($P<0,05$), при язве тела желудка в 2,2 раза ($P<0,001$). При обострении хронического гастрита этот показатель превысил уровень у здоровых людей в 2,2 раза ($P<0,05$), а при раке желудка — в 3 раза ($P<0,01$). Экскреция пировиноградной кислоты с мочой также оказалась выше нормы соответственно в 1,7 раза ($P<0,001$), 1,9 раза ($P<0,001$), 2,1 раза ($P<0,05$) и 2,5 раза ($P<0,001$).

Содержание молочной кислоты в крови в период обострения язвенной болезни было выше нормы при поражении пилородуоденальной зоны в 1,6 раза ($P<0,001$), тела желудка — в 2,1 раза ($P<0,05$). Особенно высокой (в 2,6 раза больше нормы) она оказалась у больных раком желудка ($P<0,001$).

В отличие от пировиноградной и молочной кислот концентрация уксусной кислоты у больных язвенной болезнью в этом периоде оказалась ниже, чем у здоровых людей: при язве пилородуоденальной зоны в 1,2 раза ($P<0,05$), при язве тела желудка в 1,3 раза ($P<0,05$). В том же направлении изменялось содержание в крови лимонной кислоты: во время обострения оно оказалось ниже

нормы соответственно в 1,3 раза ($P < 0,05$) и 1,4 раза ($P < 0,05$), при хроническом гастрите, напротив, превысило уровень у здоровых людей в 1,3 раза ($P > 0,05$), причем особенно резко (в 1,4 раза) у больных раком желудка ($P < 0,001$). Содержание щавелевоуксусной кислоты в крови страдающих язвенной болезнью и здоровых людей различалось несущественно.

Как следует из таблицы, при улучшении состояния больных язвенной болезнью наблюдалось значительное уменьшение содержания пировиноградной кислоты в крови и моче: при язве пилородуоденальной зоны соответственно в 2,1 и 1,6 раза ($P < 0,01$), при язве тела желудка — в 2 и 1,7 раза ($P < 0,001$). Снизилась также концентрация молочной кислоты в крови — соответственно в 1,6 раза ($P < 0,01$) и 1,3 раза ($P < 0,05$). Содержание в крови лимонной кислоты в этот период возросло соответственно в 1,5 ($P < 0,01$) и 1,2 раза ($P < 0,05$).

При улучшении состояния больных хроническим гастритом концентрация пировиноградной кислоты в крови снизилась в 1,5 раза ($P > 0,05$), а ее экскреция с мочой — в 1,8 раза ($P < 0,05$). Уменьшилось также содержание в крови молочной (в 1,7 раза; $P < 0,05$) и лимонной (в 1,2 раза; $P > 0,05$) кислот.

Накопление в крови конечных продуктов гликолиза — пировиноградной и молочной кислот, а также увеличение экскреции пировиноградной кислоты с мочой при одновременном снижении концентрации уксусной и лимонной кислот свидетельствуют о торможении у больных язвенной болезнью окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты при достаточной интенсивности гликолиза. Блок процесса биологического окисления на участке перехода пировиноградной кислоты в ацетил-КоА при язвенной болезни, вероятно, обусловлен нарушением функции пируватдегидрогеназной системы вследствие уменьшения образования кокарбоксилазы [17]. Дефицит последней у страдающих язвенной болезнью, по-видимому, обусловлен недостаточным всасыванием предшественника кокарбоксилазы — тиамина — вследствие свойственной им низкой активности кишечной фосфатазы [18]. Этот фермент является фукогликопротеидом. Его синтез генетически сопряжен с формированием гликопротеидов, имеющих антигенные свойства группы крови системы АВН и участвующих в формировании слизевого барьера гастродуоденальной системы [19]. Известно, что при язвенной болезни соединения такого типа имеют последствием обусловленные особенности, затрудняющие их секрецию [20]. В связи с этим свойства слизи и тканей гастродуоденальной системы ослабляются вследствие дефицита их основного протектора. Особенности строения фукогликопротеида при язвенной болезни обуславливают уменьшение резистентности желудка и двенадцатиперстной кишки еще одним путем. Угнетение их секреции вызывает нарушение энергообеспеченности клеток. Связь этого явления с одним из основных патогенетических механизмов язвенной болезни определяет его специфичность. При хроническом гастрите и раке желудка не удалось обнаружить нарушения окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты. Специфичность такого нарушения дает основание использовать его признаки для диагностики язвенной болезни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kirsner — Gastroenterology, 1964, v. 46, p. 706—714.
2. Опарин А. Г. — Казан. мед. ж., 1971, № 4, с. 22—24.
3. Зоря В. Г. — Врач. дело, 1957, № 10, с. 1098—1099.
4. Ротенберг Д. Л. Роль эритроцитотерапии при язвенной болезни. Автореф. дис. докт. Львов, 1950.
5. Король А. Е. Характеристика показателей SH-соединений и белкового состава в крови больных хирургическими заболеваниями желудка. Автореф. дис. канд. Минск, 1972.
6. Ваарик Ж. М. — Клин. мед., 1969, № 1, с. 92—97.

7. Габай Я. А. Состояние окислительно-восстановительных процессов у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки и их лечение внутрижелудочным введением кислорода и метилурацилом. Автореф. дис. канд. Баку, 1971.
8. Спас В. В. Изменение обмена кислорода, молочной и пировиноградной кислот, ферментативной активности каталазы и угольной ангидразы в организме больных во время эндотрахеального эфирно-кислородного наркоза и оперативного вмешательства. Автореф. дис. канд. Минск, 1972.
9. Мендель А. К. — В кн.: Актуальные вопросы хирургии. Киев, 1962, с. 105—108.
10. Литинская Э. В. Обеспеченность витаминами В₁, В₆, РР и С больных язвенной болезнью в условиях лечения холиноблокирующими препаратами. Автореф. дис. канд. Киев, 1973.
11. Friedeman, Haugen — J. biol. Chem., 1943, v. 147, p. 415—419.
12. Buchner Modern. Chem. Meth. in d. Klin. Leipzig, 1965.
13. Natelson, Pincus, Lugovoj — J. biol. Chem., 1948, v. 175, № 2, p. 745—750.
14. Martius — Hoppe — Seijler/Thierfelder — Handb. d. physiol. w. pathol. chemischen Analyse, X. Aufl., Bd 111/1. Berlin, Springer, 1955.
15. Bonting — Arch. Biochem. 1955, v. 58, p. 100—105.
16. Ciaranji, Tonnesu — Biochem. J., 1952, v. 50, p. 698—701.
17. Каменецкий Ш. Э. — Врач. дело, 1957, № 8, с. 811—814.
18. Shaller, Höller — Int. G. Vitam. and Nutr. Res., 1975, v. 45, № 1, p. 30—38.
19. Рабинович П. Д., Домрачева Н. И. — Тер. арх., 1976, № 6, с. 67—71.
20. Мехтиев Н. Х., Деушева Г. Г., Рущ М. А. — Успехи биол. химии, 1976, т. 15, с. 156—165.

Поступила 30/I 1979 г.

CONTENT OF SOME METABOLITES OF BIOLOGICAL OXIDATION IN BLOOD AND URINE OF PATIENTS WITH ULCER

P. D. Rabinovich, P. V. Milyushkin

Chair of Faculty Therapeutics, State Medical School, Saratov, Chair of Hospital Therapy, State Medical School, Chita

Content of pyruvic, lactic, citric, acetic, oxaloacetic acids in blood as well as excretion of pyruvic acid with urine were studied in patients with ulcer, chronic gastritis, carcinoma of the stomach and in healthy persons. Concentrations of pyruvic and lactic acids in blood as well as excretion of pyruvic acid with urine were increased in the patients during acute periods of ulcerous disease, chronic gastritis and in carcinoma of the stomach. Level of citric acid was decreased in blood in ulcerous disease and increased in chronic gastritis and, especially, in the carcinoma. During acute period of ulcerous disease concentration of acetic acid was decreased in blood. Content of oxaloacetic acid was similar both in healthy persons and in patients with the disease. The data obtained suggest that oxidative decarboxylation of pyruvic acid is inhibited in patients with ulcerous disease.

УДК 612.123/.124-087

Л. Г. Артемова, Т. И. Торховская, И. А. Щербакова, Н. П. Чернышова,
С. Н. Сучкова, О. А. Азизова, Ю. А. Владимиров

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЛИПОПРОТЕИДОВ ПЛАЗМЫ С ПОМОЩЬЮ СПИН-МЕЧЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

ИИ*Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова, Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

В последние годы получена значительная информация о роли отдельных классов липопротеидов (ЛП) плазмы в сложной цепи биохимических и биофизических процессов, связанных с патогенезом атеросклероза [1—3]. Есть основания полагать, что система ЛП плазмы может служить своеобразным регулятором уровня холестерина в клеточных мембранах. Об этом свидетельствует продемонстрированная *in vitro* способность ЛП высокой плотности (ЛВП) удалять холестерин из мембран [4], а ЛП низкой и очень низкой плотности (ЛНП и ЛОНП соответственно) — отдавать холестерин мембранам [5]. Вместе с тем накопление холестерина в мембранах гладко-мышечных клеток аорты является, согласно гипотезе Джексона и Готто [6], молекулярным «пусковым механизмом» развития атеросклероза.

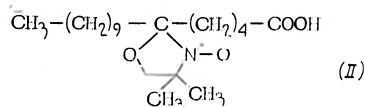
Следовательно (в случае справедливости этой гипотезы) роль ЛВП и ЛП других классов в атерогенезе должна быть противоположной. Это подтверждается данными эпидемиологических исследований, выявивших большую частоту заболеваемости атеросклерозом и ишемической болезнью сердца (ИБС) у лиц с высокой концентрацией ЛНП и ЛОНП [3] и, напротив, снижение частоты заболеваемости при высоком уровне ЛВП [7]. Приведенные факты показывают, что процессы взаимодействия ЛП плазмы с клеточными мембранами являются существенными в атерогенезе. Для понимания механизмов этих процессов необходимо располагать данными как о химическом составе ЛП, различном для каждого класса [3], так и о молекулярной структуре ЛП, что возможно лишь при использовании специальных физических методов. В последние годы появились работы по исследованию структуры ЛП плазмы с помощью таких методов, в том числе метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов [8--13]. Однако внимание исследователей было направлено главным образом на изучение структуры и конформации белков — апопротеинов. В настоящей работе методом спиновых зондов изучалась структура липидных областей ЛП различных классов. Сравнение поведения этих зондов в ЛП различной плотности позволило выявить структурные различия липидных областей исследуемых ЛП. Краткое сообщение о полученных результатах было опубликовано ранее [14].

Методика

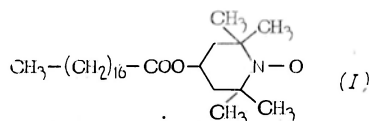
1. *Получение и характеристика препаратов ЛП.* Материалом исследования служила плазма крови 38 здоровых мужчин в возрасте от 40 до 59 лет, вызванных для эпидемиологического обследования. Указанные лица не обладали признаками ИБС и имели концентрации липидов (холестерина и триглицеридов) в плазме в пределах нормальных величин [3]. ЛВП, ЛНП и ЛОНП выделяли с помощью препаративного ультрацентрифугирования [15]. Концентрации холестерина и триглицеридов в плазме и в выделенных препаратах ЛП определяли с помощью автоанализатора «Техникон АП» (США). Концентрацию фосфолипидов [16] и белка [17] определяли обычными методами.

2. *Введение спиновых зондов в ЛП.* В работе использовались следующие спиновые зонды:

I — нитроксильное производное стеариновой кислоты с пиперидиновым циклом, присоединенным через сложно-эфирную связь;



II — нитроксильное производное пальмитиновой кислоты с оксазолидиновым циклом в шестом положении жирно-кислотной цепи.



Зонды вводили в ЛП путем добавления к препаратам ЛП 1% (по объему) раствора спинного зонда в этаноле. Все препараты ЛП предварительно разбавляли физиологическим раствором до постоянной концентрации суммарных липидов 10^{-3} М. Молярное соотношение зонд/липид составляло 1 : 100.

3. *Запись спектров ЭПР.* Спектры ЭПР спин-меченных ЛП регистрировали на радиоспектрометре Е-4 фирмы «Вариан» (США) при следующих условиях: микроволновая мощность 10 мВт, частота ВЧ-модуляции 100 кГц, амплитуда ВЧ-модуляции 1—2 Гс, напряженность магнитного поля 3240 Гс, диапазон развертки магнитного поля 100 Гс, температура 20°C, объем образца около 70 мкл.

4. *Параметры спектров ЭПР зондов в ЛП* [18]. Для характеристики зондов, выведенных в ЛП, были выбраны следующие параметры:

h — параметр гидрофобности среды, где находится парамагнитный фрагмент радикала, определялся через константы сверхтонкого взаимодействия (СТВ; см. рис. 1, а)

$$h = \frac{a_B - a_{ис}}{a_B - a_F},$$

где a_B , a_F , $a_{ис}$ — константы СТВ соответственно для воды, гидрофобной среды (типа гептана) и исследуемой системы;

τ_c — время вращательной корреляции, характеризующее подвижность зонда, вычислялось по формуле:

$$\tau_c = 6,65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_i \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_{-1}}} - 1 \right),$$

где ΔH_i — ширина каждой линии, $i = +1, 0, -1$; I_i — амплитуда компонент спектра (см. рис. 1, а); S — параметр упорядоченности, связанный с ориентацией жир-

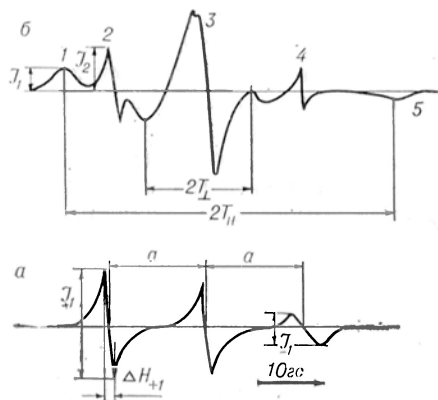


Рис. 1. Типичные спектры ЭПР спиновых зондов в ЛП (приведены спектры зондов в ЛВП из плазмы с нормальным уровнем холестерина).

а — зонд I; б — зонд II.

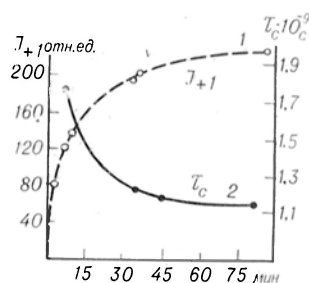


Рис. 2. Кинетика встраивания зонда II в ЛВП с нормальным уровнем холестерина.

1 — амплитуда низкогопольного пика (I_{+1}); 2 — время корреляции вращения (τ_c).

но-кислотных цепей фосфолипидов в ЛП, определялся как

$$S = \frac{T_{\parallel} - T_{\perp}}{T_{\parallel} + 2T_{\perp}} \cdot \alpha,$$

где $2T_{\parallel}$ и $2T_{\perp}$ — расстояния между внешними и внутренними экстремумами спектра ЭПР (рис. 1, б). Значение константы $\alpha = 1,64$ рассчитывали из таблиц [18]. Константу СТВ для зонда II определяли по формуле:

$$a = \frac{T_{\parallel} + 2T_{\perp}}{3};$$

ε — параметр, характеризующий степень несферичности вращения радикала, определяли по формуле:

$$\varepsilon = \frac{\sqrt{I_0/I_{+1}} - 1}{\sqrt{I_0/I_{-1}} - 1}.$$

Результаты

1. *Характеристика зонда I в ЛП.* Зонд I встраивается в ЛП в течение 2—3 ч, при этом спектр ЭПР изменяется от широкой синглетной линии, отражающей мицеллярное расположение молекул зонда в воде, до триплета, обусловленного зондом, распределенным в липидных областях ЛП (см. рис. 1, а). Изменение параметров триплетного сигнала (амплитуды сигнала и времени корреляции) показано на рис. 2. Рост амплитуды сигнала обусловлен растворением радикала в липидных областях ЛП, а уменьшение τ_c отражает, по-видимому, большую подвижность зонда во внутренних областях ЛП (куда зонд проникает позже), чем в наружных.

Общий вид спектров ЭПР зонда I после встраивания близок для всех классов ЛП, однако по некоторым параметрам они различаются, что будет рассмотрено ниже.

Для оценки полярности областей, в которых локализован зонд I, было проведено сравнение значений константы СТВ в ЛП различных классов, в ряде растворителей, а также в модельных системах двух типов: в озвученных смесях триглицеридов и эфиров холестерина (ТГ + ЭХ) и в смесях фосфолипидов и свободного холестерина (ФЛ + ХС) (указанные липиды выделялись из препаратов ЛОНП). По существующим представлениям первые являются составными частями внутренних неполярных областей, вторые — липидными компонентами поверхностного слоя ЛП [3, 19]. Значение константы СТВ (табл. 1) для зонда I в ЛП всех классов одинаково и равно $15,5 \pm 0,1$ Гс, что значительно меньше ее значения для зонда в воде (16,7 Гс) и близко к соответствующему значению для исследованных модельных систем и неполярных растворителей (15,2 Гс). Значение параметра гидрофобности $h=0,67$ свидетельствует о довольно гидрофобном окружении зонда I во всех классах ЛП.

Значения других параметров спектров ЭПР: τ_c и ϵ , для разных классов ЛП приведены в табл. 2. ЛОНП и ЛВП различаются по параметру ϵ , зависящему как от несферичности вращения радикала, так и от константы СТВ [18]. Поскольку последняя, как отмечалось, для всех классов ЛП одинакова, различия параметра ϵ следует отнести за счет разной степени несферичности вращения радикала в ЛОНП и ЛВП, т. е. различного характера их движения.

Наибольшей подвижностью (т. е. наименьшим τ_c) зонд I обладает в ЛОНП. В ЛВП движение его значительно заторможено, что говорит о наибольшей вязкости липидов внутренней области в ЛВП.

2. *Характеристика зонда II в ЛП.* Зонд II встраивается в ЛП менее, чем за 1 мин. Спектр ЭПР этого зонда в ЛП (см. рис. 1, б) свидетельствует

Таблица 1
Константы СТВ для зондов I и II в ЛП и в средах различной полярности

Среда	Константа СТВ (в Гс) $\pm 0,1$	
	зонд II	зонд I
Препараты ЛП	14,7*	15,5
Эмульсия ФЛ + ХС	15,3**	
Эмульсия ТГ + ЭХ	15,2	15,4
Гексан	15,1	15,2
Декалин ***	—	14,9
Этилбензол ***	—	15,2
Циклогексан ***	—	15,2
Этиловый спирт	13,9	—
Вода	14,5	15,6
	15,3	16,7

Примечание. Одной звездочкой указаны значения для «неполярного», двумя — для «полярного» сигналов. Для сред, отмеченных тремя звездочками, приведены данные А. Н. Кузнецова [18].

Таблица 2
Параметры спектров ЭПР спиновых зондов в ЛП

Класс ЛП	Зонд I		Зонд II	
	$\epsilon \cdot 10^9 \times \times (\pm 0,1) \text{ с}$	$\epsilon (\pm 0,007)$	$S (\pm 0,007)$	I_1/I_2
ЛВП	2,15	—0,05	0,74	0,40
ЛНП	1,95	—0,17	0,72	0,05
ЛОНП	1,30	—0,15	0,68	0,02

Таблица 3
Липидный состав ЛП

Класс ЛП	Классы липидов, % от всех липидов		
	фосфолипиды	холестерин	триглицериды
ЛВП	$46,9 \pm 1,6$	$44,3 \pm 1,6$	$8,8 \pm 1,0$
ЛНП	$28,2 \pm 1,1$	$63,5 \pm 2,1$	$8,3 \pm 0,9$
ЛОНП	$16,6 \pm 0,5$	$19,7 \pm 1,1$	$63,6 \pm 1,8$

о существовании по крайней мере двух областей его локализации. Три симметрично расположенные узкие линии (2, 3 и 4) обусловлены быстровращающимся зондом, парамагнитный фрагмент которого находится в водной области. Это подтверждается значением константы СТВ (15,3 Гс), равным этой величине для воды (см. табл. 1), а также результатами исследования влияния различных агентов на спектр ЭПР зонда в ЛП, изложенными ниже.

Крайние — широкие линии спектра (см. рис. 1, а, линии 1 и 5) определяются зондом, вращающимся медленнее и значительно ориентированным средой, о чем свидетельствует высокое значение степени упорядоченности (S), равное 0,7. Величина константы СТВ этого зонда равна 14,75 Гс, что приближается к значению этой величины для неполярных сред (см. табл. 1). Высокая гидрофобность окружения ($h=0,46$) показывает, что зонд, обуславливающий широкие компоненты спектра ЭПР, находится в неполярном окружении, однако менее гидрофобном, чем зонд I (h зонда I = 0,67). На основании этих данных, а также исходя из модели ЛП как гидрофобной липидной глобулы, окруженной мономолекулярным слоем главным образом фосфолипидов [19], можно предположить, что зонд II встраивается в поверхностный слой ЛП. При этом карбоксильная группа локализуется, вероятно, вблизи поверхности ЛП между полярными группами фосфолипидов, а иминоксильный радикал у 6-го углеродного атома располагается среди их жирнокислотных цепей. Подобное расположение жирнокислотных зондов в ЛП предполагалось и ранее [20].

Соотношения амплитуд низкополевых компонентов спектра I_1/I_2 , характеризующее распределение зонда между неполярной и полярной областями, в различных классах ЛП, приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, эти соотношения различны для ЛВП, ЛНП и ЛОНП: в ЛВП количество зонда, встроеного в неполярные области, наибольшее, а в ЛОНП — наименьшее. На основании вышеприведенных данных, свидетельствующих о том, что этот зонд встраивается в фосфолипиды, указанные различия могут быть объяснены различным содержанием фосфолипидов в трех классах ЛП — максимальным для ЛВП и минимальным для ЛОНП (табл. 3).

Классы ЛП различаются и по параметру упорядоченности зонда S (см. табл. 2). Уменьшение S в ряду ЛВП, ЛНП и ЛОНП свидетельствует о том, что жирнокислотные цепи фосфолипидного монослоя наиболее подвижны в ЛОНП, а наиболее ориентированы в ЛВП.

3. *Влияние восстанавливающих агентов и парамагнитных уширителей.* Для конкретизации областей ЛП, в которые встраивались зонды I и II, была использована методика «парамагнитного тушения» и восстановления зондов аскорбиновой кислотой [21]. Введение в спин-меченные ЛП парамагнитных комплексов (в данной работе положительно заряженного дибензолхромйодида — ДБХИ) отрицательно заряженного феррицианида калия, а также $NiCl_2$ позволило по изменению спектров ЭПР в результате диполь-дипольного или обменного взаимодействия парамагнитных частиц различить зонды, находящиеся в полярных, доступных для воды, и неполярных областях ЛП. Результаты проведенных опытов приведены в табл. 4. Спектр ЭПР зонда I в ЛП существенно не изменялся при добавлении указанных парамагнитных тушителей, что свидетельствует о расположении парамагнитного фрагмента этого зонда в неполярных областях ЛП.

Быстрое уменьшение амплитуды узкого «полярного» сигнала зонда II (см. рис. 1, б, линии 2, 3, 4) при добавлении $NiCl_2$ и феррицианида подтверждает сделанное ранее предположение о локализации парамагнитного фрагмента этого зонда в водной области. Линии «неполярного» широкого сигнала зонда II (см. рис. 1, б, линии 2, 3, 4) под действием феррицианида не уширялись, хотя амплитуда сигнала уменьшалась, что говорит о сорбции отрицательно заряженного феррицианида на ЛП. Вероятно, вблизи

областей локализации парамагнитного фрагмента зонда II имеются положительно заряженные группировки, например холиновые группы лецитина — преобладающего фосфолипида ЛП [19]. Наиболее информативным для выяснения локализации зондов в ЛП, а также структурных особенностей ЛП оказалось изучение влияния аскорбиновой кислоты на спектры ЭПР зондов в ЛП. 2 мМ аскорбиновая кислота восстанавливает нитроксильную группу зонда до гидроксиламина, который не дает сигнала ЭПР. Эта реакция является реакцией псевдопервого порядка. График зависимости $\ln A$ (где A — амплитуда сигнала) от времени представлял собой прямую, по наклону которой определялась константа скорости реакции аскорбиновой кислоты с радикалом. В физиологическом растворе для зонда II эта величина (K_{II}^{11}) оказалась равной $130 \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Аскорбиновая кислота восстанавливала зонд II в ЛП с одинаковой скоростью для узкого и

Т а б л и ц а 4

Влияние различных парамагнитных унширителей и аскорбиновой кислоты на амплитуду сигналов ЭПР зондов I и II в ЛП

Зонды	1 мМ ДБХИ $t_{1/2}$	0,3М NiCl ₂ $t_{1/2}$	0,2М феррицианид $t_{1/2}$	2 мМ аскорбиновой кислоты К ($\text{М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$)
Зонд I	>6 ч	>6 ч	—	ЛВП — 46±2 ЛНП — 29±3 ЛОНП — 18±2
«Полярный» сигнал Зонд II	>6 ч	≤1 мин	<1 мин	13,0
«Неполярный» сигнал	>6 ч	~1 ч	~10 мин	

П р и м е ч а н и е. $t_{1/2}$ — время, за которое амплитуда сигнала уменьшается в 2 раза.

широкого сигналов, причем эта скорость мало изменялась в зависимости от класса ЛП и была близка или несколько меньше K_{II}^{11} . Возможно, что аскорбиновая кислота быстро восстанавливала зонд II вследствие его обмена между полярной и неполярной областями в поверхностном монослое. Скорость восстановления зонда I в ЛП зависела от типа ЛП — наиболее быстрым было восстановление зонда в ЛВП, наименее быстрым — в ЛОНП (см. табл. 4). Наблюдаемые различия в скоростях восстановления обусловлены, вероятно, различной скоростью диффузий аскорбата в зоны локализации зонда.

О б с у ж д е н и е

Полученные результаты дают основание полагать, что зонды I и II встраиваются в разные участки ЛП. Зонд II встраивается в поверхностный фосфолипидный монослой ($h=0,46$), а зонд I — в более гидрофобную область, состоящую из ЭХ и ТГ ($h=0,67$). На основании сравнения параметров спектров ЭПР зондов I и II в ЛП можно сделать выводы о структуре гидрофобного «ядра» и фосфолипидного монослоя в трех классах ЛП.

Сравнение влияния на спектры ЭПР зондов парамагнитных ионов с различными зарядами показывает, что поверхность ЛП частиц вблизи мест локализации зонда II имеет положительный заряд. Об этом свидетельствует тот факт, что феррицианид, содержащий отрицательно заряженный парамагнитный ион, может сорбироваться на поверхности ЛП и ушширять сигнал ЭПР зондов.

ЛВП, ЛНП и ЛОНП различаются по подвижности жирно-кислотных цепей липидов как во внутренней, так и во внешней областях. В ЛВП ин-

тенсивность молекулярного движения в гидрофобных внутренних областях наименьшая ($\tau_c = 2,15 \cdot 10^{-9}$ с); она возрастает в ЛНП и особенно в ЛОНП. Следует отметить, что в модельных системах ТГ + ЭХ и ФЛ + ХС подвижность зонда I довольно велика ($\tau_c = 1,1 \div 1,5 \cdot 10^{-9}$ с). Уменьшение подвижности зонда I в ЛП может быть обусловлено значительным влиянием белка на микровязкость внутренней неполярной области. Это подтверждается также и тем, что максимальное снижение подвижности зонда I наблюдалось для тех классов ЛП, где количество белка было наибольшим — ЛВП [3, 19].

Внешний фосфолипидный монослой ЛВП имеет большую степень упорядоченности ($S=0,7$) по сравнению с ЛП других классов, что также может быть связано с присутствием белка. В ряде работ [19, 22, 23] было показано, что ФЛ и ЭХ оказывают существенное влияние на состояние апопротеинов в ЛП, приводят к упорядочиванию их структуры и увеличению доли α -спиральной конформации. Проведенные исследования показали, что существует и обратное влияние белка на структуру липидной части ЛП — увеличиваются микровязкость внутренней области и степень упорядоченности поверхностного фосфолипидного монослоя ЛП. Подобное явление наблюдалось ранее для модельных систем [24]. Во внешнем слое ЛП подвижность жирно-кислотных цепей липидов меньше, чем во внутренней области, что следует из изменения τ_c для зонда I в процессе встраивания (см. рис. 2).

Наибольшая подвижность липидов в ЛОНП (как во внутренней, так и во внешней области) может быть одним из факторов, облегчающих их доступность действию липопроотеидлипазы [1]. Более плотная упаковка липидных молекул в ЛНП, продуктах действия этого фермента [1], может определять предел ее действия и препятствовать дальнейшему расщеплению триглицеридов в ЛНП. Это подтверждается данными о предпочтительном действии липопроотеидлипазы на более жидкие области [25].

Наиболее чувствительным параметром к типу ЛП оказалась доступность зонда I для аскорбиновой кислоты: она монотонно снижается в ряду ЛВП, ЛНП, ЛОНП. Наблюдаемые различия могут быть связаны как с изменением химического состава ЛП, так и с различными размерами ЛП частиц (от 100 Å для ЛВП до 800—900 Å для ЛОНП [3]). В работе Кейта и соавт. [13] также наблюдалась большая скорость тушения сигнала ЭПР жирно-кислотных спиновых зондов в ЛВП, чем в ЛНП, и авторы объяснили это только различием в размере частиц. Однако проведенные опыты с озвученными смесями ТГ + ЭХ и ФЛ + ХС свидетельствуют о том, что размер частиц не является фактором, определяющим различие в скоростях реакции восстановления зонда. В этих смесях спиновый зонд I восстанавливается аскорбиновой кислотой очень медленно, хотя размеры образующихся частиц близки к размерам ЛОНП и ЛНП соответственно [26]. Другим возможным объяснением может быть наличие в ЛВП большего количества белка [3], который, согласно современной модели строения ЛП [19], внедряется в фосфолипидный монослой мозаичным порядком. При этом образуются значительные области белок-фосфолипидного контакта, представляющие собой как бы «поры», в которых может локализоваться зонд и куда проникает аскорбиновая кислота. В ЛВП таких областей больше, что делает зонд более доступным для аскорбиновой кислоты. Такой же вывод сделан в работе [27], где показано, что добавление апопротеина (апо-С III) к фосфолипидным везикулам значительно увеличивает проницаемость полученного липидно-белкового комплекса для аскорбиновой кислоты.

Можно полагать, что повышенная проницаемость поверхностного слоя в ЛВП по сравнению с другими классами ЛП создает благоприятные условия для продемонстрированных недавно холестерин-акценторных свойств ЛВП [4, 28] и может быть одной из причин их антиатерогенного характера [2, 7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Eisenberg S. — In: Atherosclerosis Reviews. Ed. R. Paoletti, A. M. Gotto. New York, 1976, v. 1, p. 23.
2. Герасимова Е. И. — Тер. арх., 1976, № 6, с. 40.
3. Климов А. Н. — В кн.: Превентивная кардиология. М., 1977, с. 260—321.
4. Stein O., Vanderholk J., Stein Y. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 431, p. 347.
5. Bierman E. L., Albers J. J. — Ibid., 1975, v. 388, p. 198.
6. Jackson R. L., Gotto A. M. — In: Atherosclerosis Reviews. Ed. R. Paoletti, A. M. Gotto. New York, 1976, v. 1, p. 1.
7. Castelli W. P., Doyle J. T., Gordon T. — Circulation, 1977, v. 55, p. 767.
8. Gotto A. M., Kon H. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1964, v. 37, p. 444.
9. Gotto A. M., Kon H. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 65, p. 145.
10. Gotto A. M., Kon H. — Biochem. istr. (Wash.), 1970, v. 9, p. 4276.
11. Barrat M. D., Leslie R. B. — Chem. Phys. Lipids, 1971, v. 7, p. 345.
12. Leslie R. B. — In: Plasma Lipoproteins, Ed. R. M. S. Smellie. New York, 1971, p. 54.
13. Keith A. D., Mehuhorn R. I., Freeman N. K. et al. — Chem. Phys. Lipids, 1973, v. 10, p. 223.
14. Артемова Л. Г., Торховская Т. И., Суикова С. И. и др. — В кн.: Всесоюзный симпозиум «Магнитный резонанс в биологии и медицине». Тезисы. Черноголовка, 1977, с. 119.
15. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon I. H. — J. clin. Invest., 1955, v. 34, p. 1345.
16. Svannborg A., Svennerholm L. — Acta med. scand., 1961, v. 169, p. 43.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
18. Кузнецов А. И. Метод спинного зонда. М., 1976.
19. Morrisett I. D., Jackson R. L., Gotto A. M. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 472, p. 93.
20. Керимов Т. М., Перова Н. В., Щербакова И. А. и др. — Вopr. мед. химии, 1978, № 9, с. 559.
21. Лухтеништейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М., 1974.
22. Lux L., Hirz R., Schrager R. I. et al. — J. biol. Chem., 1972, v. 247, p. 2598.
23. Segrest I. P. — FEBS Letters, 1976, v. 69, p. 111.
24. Pownall H. I., Morrisett I. P., Gotto A. M. — J. Lipids Res., 1977, v. 18, p. 14.
25. Smith L. C., Miller A. L., Taunton O. D. et al. — Circulation, 1973, Suppl. 4, Abstr. 445.
26. McCabe P., Green C. — Chem. Phys. Lipids, 1977, v. 20, p. 319.
27. Novosad Z., Knapp R., Gotto A. M. — Biochemistry (Wash.), 1976, v. 15, p. 3176.
28. Jonas A., Hesterberg L. K., Dungler S. M. — Biochim. biophys. Acta, 1978, v. 528, p. 47.

Поступила 13/II 1979 г.

STUDY OF STRUCTURE CHARACTERISTICS OF BLOOD PLASMA LIPOPROTEINS USING SPIN-LABELLED FATTY ACIDS

L. G. Artemova, T. I. Torkhovskaya, I. A. Scherbakova, N. P. Chernyshova,
S. N. Suchkova, O. A. Azizova, Yu. A. Vladimirov

N. I. Pirogov II Medical Scholl, All-Union Cardiology Research Centre, Academy of
Medical Sciences of the USSR, Moscow

As shown by means of electron paramagnetic resonance of spin probes, a magnitude of ordering of lipoprotein molecular arrangement both in internal and external parts of molecule was decreased in a following sequence: high density lipoproteins > low density > very low density lipoproteins. Permeability towards a reducing agent — ascorbic acid — was altered similarly in the lipoprotein surface monolayer.

В. А. Арбузов, Г. Д. Кречетова, М. И. Пигарева

РАЗРУШЕНИЕ мРНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ *IN VIVO* ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА ЦИКЛОГЕКСИМИДОМ

Лаборатория энзимологии АМН СССР, Онкологический научный центр АМН СССР,
Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР, Москва

Ранее было показано, что ингибирование белкового синтеза циклогексимидом (ЦГИ) приводит к стабилизации мРНК [1, 2] и подавлению ядерно-цитоплазматического транспорта мРНК [1, 3] в клетках печени крыс. При этом отмечалась стабилизация именно мРНК мембраносвязанных полирибосом печени [4, 5]. С другой стороны, ЦГИ или не влиял на деградацию мРНК свободных полирибосом [4], или стабилизировал ее в меньшей степени, чем мРНК мембраносвязанных полирибосом [5].

В отличие от нормальных клеток печени в опухолях — клетках HeLa [6] и перевиваемой асцитной гепатоме Зайдела крыс [7] — ядерно-цитоплазматический транспорт мРНК не изменяется при ингибировании ЦГИ белкового синтеза. В связи с этим представляет интерес изучить влияние ингибиторов белкового синтеза на разрушение мРНК в опухолевых клетках, тем более что до сих пор этот вопрос не выяснен.

В настоящей работе исследовано разрушение мРНК в клетках асцитной гепатомы Зайдела крыс в условиях *in vivo* на фоне подавления ЦГИ синтеза белка.

М е т о д и к а

В опытах использовали крыс линии Вистар массой 180—200 г на 6-й день после перевивания (внутрибрюшинно) асцитной гепатомы Зайдела. Клетки гепатомы отмывали от эритроцитов [8] и суспендировали в 2 объемах бидистиллированной воды. После выдерживания при 4°C в течение 10 мин (стадия осмотического шока) клетки осаждали центрифугированием при 3000 g 7 мин и суспендировали в 2 объемах охлажденного 0,1 М трис-НСl-буфера pH 7,6, содержащего 0,01 М MgCl₂, 0,05 М KCl (двойной ТКМ-буфер) и 0,5 М сахарозу. Разрушение клеток гепатомы проводили в проточном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Гомогенат центрифугировали при 600 g 10 мин для удаления ядер. Надосадочную жидкость центрифугировали при 15 000 g 10 мин для удаления митохондрий, фракцию S-15 использовали в дальнейших опытах.

Определение содержания радиоактивных РНК в цитоплазме клеток гепатомы. Крысам с асцитной гепатомой Зайдела вводили внутрибрюшинно по 80—110 мкКи ³H-уридина (удельная радиоактивность 58,1 мКи/мг) или по 100—120 мкКи ¹⁴C-уридина (удельная радиоактивность 47,5 мКи/мМ). В разные сроки после радиоактивных предшественников РНК животным одной группы вводили актиномицин D 5 мг/кг («Reanal», Венгрия) для полного подавления синтеза РНК в клетках гепатомы Зайдела [8], а крысам другой группы — актиномицин D в той же дозе вместе с ЦГИ — 100 мг/кг (фирма «Calbiochem», США) [7]. Крыс забивали в разные сроки после введения ингибиторов.

Для определения радиоактивности РНК в цитоплазме клеток гепатомы к фракции S-15, находящейся в ледяной бане, прибавляли равный объем охлажденной 10% ТХУ. Кислотонерастворимый материал дважды промывали охлажденной 5% ТХУ и один раз — охлажденной смесью спирта с эфиром (1 : 1). Осадки кислотонерастворимого материала подсушивали при 37°C, после чего проводили щелочной гидролиз РНК (инкубация с 0,3 н. КОН при 37°C в течение 1 ч). В гидролизате определяли радиоактивность и оптическую плотность при 260 нм. Для подсчета радиоактивности 1 мл обессоленного гидролизата РНК [1] вносили в стаканчики для счета, содержащие по 10 мл жидкости ЖС-8. Радиоактивность трития и углерода определяли по числу распадов в минуту с использованием программы, рассчитанной для данной сцинтилляционной жидкости и данного растворителя.

Для определения радиоактивности суммарной мРНК по фракции S-15 крысам с асцитной гепатомой Зайдела за 1 ч до радиоактивных предшественников РНК вводили внутрибрюшинно актиномицин D (0,25 мг/кг) для избирательного подавления синтеза рибосомных РНК (рРНК) [8]. В остальном постановка опытов была такой же, как описано выше. Поли-(А)-мРНК выделяли из фракции S-15 с использованием нитроцеллюлозных фильтров («Millipore», 25 мм, 0,45 м) [1,2].

Центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы. 3 мл фракции S-15 после обработки дезоксихолатом натрия (ДХН; конечная концентрация 1,2%) насливали на 26 мл линейного градиента концентрации сахарозы (5—30%), приготовленного на ТКМ-буфере (0,05 М трис-НСI-буферный раствор pH 7,6, содержащий 0,005 М $MgCl_2$ и 0,025 М KCl). Центрифугирование в градиенте сахарозы проводили при 23 000 об/мин 3 ч, ротор SW-25.1, на ультрацентрифуге «Spinco L-2». Фракции градиента собирали по 10 капель. Часть каждой фракции использовали для определения оптической плотности при 260 нм, а другую часть — для измерения радиоактивности. Для определения радиоактивности к фракциям градиента на холоду прибавляли равный объем охлажденной 10% ТХУ, после чего кислотонерастворимый материал промывали 10 мл охлажденной 5% ТХУ на нитроцеллюлозных фильтрах («Millipore» 25 мм, 0,45 мкм).

Центрифугирование цитоплазматических частиц рибонуклеопротеидов (РНП) в градиенте плотности CsCl [9]. Фракцию S-15 после обработки тритоном X-100 (конечная концентрация 2%) центрифугировали при 360 000 g в течение 3 ч. Осадок цитоплазматических РНП-частиц суспендировали в 0,02 М триэтаноламинном буферном растворе pH 7,6, содержащем 0,005 М $MgCl_2$, 0,025 М KCl и 0,001 М β -меркаптоэтанол (ТЕА-буфер), конечный объем 0,9 мл. К суспензии РНП-частиц прибавляли 40% формальдегид, приготовленный на ТЕА-буфере, до конечной концентрации 4%. Фиксацию РНП-частиц в растворе формальдегида проводили при 4°C в течение 24 ч. После этого к суспензии прибавляли 350 мг сухого CsCl и суспензию насливали на трехступенчатый градиент CsCl, состоящий из равных объемов (по 1,25 мл) 53, 45 и 39% растворов CsCl, приготовленных на ТЕА-буфере. Центрифугирование проводили при 40 000 об/мин в течение 24 ч, ротор SW-50.1. Фракции градиента собирали по 5 капель. Часть каждой 4-й фракции градиента отбирали для рефрактометрии. Для подсчета радиоактивности часть каждой фракции градиента наносили на диски (Whatman 3 MM), которые промывали 10 мл охлажденной 5% ТХУ и 10 мл 70% этанола. Оставшиеся порции фракций градиента использовали для определения оптической плотности при 260 нм.

Получение суммарных, мембраносвязанных и свободных полирибосом [10]. Для получения суммарных полирибосом клеток гепатомы Зайдсела фракцию S-15 после обработки ДХН (конечная концентрация 1,2%) центрифугировали через слой (3 мл) 2 М сахарозы, приготовленной на ТКМ-буфере, при 105 000 g в течение 4 ч (ротор 50 Ti). Осадки полирибосом суспендировали в ТКМ-буфере и центрифугировали через слой (3 мл) 1 М сахарозы при 105 000 g 2 ч. Полученные осадки суммарных полирибосом суспендировали в ТКМ-буфере и использовали для определения радиоактивности и содержания РНК.

Для получения мембраносвязанных и свободных полирибосом клеток гепатомы фракцию S-15 центрифугировали в двухступенчатом градиенте концентрации сахарозы, состоящем из 3 мл 2 М сахарозы и 1 мл 0,5 М сахарозы, приготовленных на ТКМ-буфере, при 105 000 g 4 ч (ротор 50 Ti). При этом свободные полирибосомы осаждаются на дно пробирки, а мембраносвязанные располагаются на границе между 0,5 и 2 М раствором сахарозы. Мембраносвязанные и свободные полирибосомы собирали отдельно, суспендировали в ТКМ-буфере и после обработки ДХН (см. выше) центрифугировали через слой (3 мл) 1 М сахарозы (см. выше). Осадки мембраносвязанных и свободных полирибосом суспендировали в ТКМ-буфере и в дальнейшем использовали для определения радиоактивности и содержания РНК.

Определение активности РНК-аз и полинуклеотидфосфорилазы (ПНФ-азы). В качестве субстрата РНК-аз использовали ^{14}C -РНК, выделенную из рибосом печени крыс. Для получения ^{14}C -РНК крысам вводили по 0,5 мКи ^{14}C -оротата на 18 ч. РНК из рибосом печени выделяли по методу [11]. Удельная радиоактивность полученной таким образом ^{14}C -РНК составляла 300 000 имп/мин на 1 мг.

При определении активности кислых РНК-аз во фракции S-15, полученной из клеток гепатомы, инкубационная смесь содержала в 1 мл: 0,1 мг ^{14}C -РНК (30 000 имп/мин), 0,15 М Na-фосфатный буферный раствор pH 5,6, 0,5 мг белка фракции S-15. Пробу инкубировали при 37°C 1 ч. После инкубации пробу помещали в ледяную баню и прибавляли к ним по 0,1 мг сывороточного альбумина и $HClO_4$ до конечной концентрации 0,5 н. [12]. Кислотонерастворимый материал осаждали центрифугированием и надосадочные жидкости использовали для определения радиоактивности кислотонерастворимого материала.

При определении активности щелочных РНК-аз во фракции S-15 инкубационная смесь содержала в 1 мл: 0,1 мг ^{14}C -РНК (30 000 имп/мин), 0,05 М трис-НСI-буферного раствора pH 7,6, 0,1 М NaCl, 0,5 мг белка фракции S-15. Инкубацию и обработку проб проводили так, как описано выше для кислых РНК-аз.

Активность эндо-РНК-азы в мембраносвязанных и свободных полирибосомах клеток гепатомы определяли, как описано ранее [12]. За 1 ед. РНК-азной активности принимали количество фермента, катализирующее освобождение 1 нКи радиоактивного материала в виде кислоторастворимых продуктов при 37°C в течение 1 ч. Удельную активность РНК-аз выражали как количество единиц активности фермента на 1 мг белка.

Активность ПНФ-азы в полирибосомах клеток гепатомы определяли по реакции фосфорилиза поли-А в присутствии ^{32}P -ортофосфата [13]. За 1 ед. активности ПНФ-

азы принимали количество фермента, катализирующее включение 1 нМ ^{32}P -ортофосфата в материал, сорбирующийся на норите, при 37°C за 1 ч. Удельную активность ПНФ-азы выражали как количество единиц активности фермента на 1 мг белка. *Аналитические методы.* Количество белка определяли по методу Лоури [14], содержание РНК — по методу Монро и Флека [15], принимая, что 1 ед. экстинкции при 260 нм соответствует 32 мкг РНК.

Результаты и обсуждение

Прежде всего мы исследовали влияние ЦГИ на содержание предварительно меченной РНК в цитоплазме клеток асцитной гепатомы Зайдела. Для этого в 3 группах крысам с гепатомой вводили ^3H -уридин (см. «Методика») на 20 мин. После этого в одной группе животным инъецировали актиномицин D (5 мг/кг), в другой — актиномицин D вместе с ЦГИ. Крыс забивали через разные промежутки

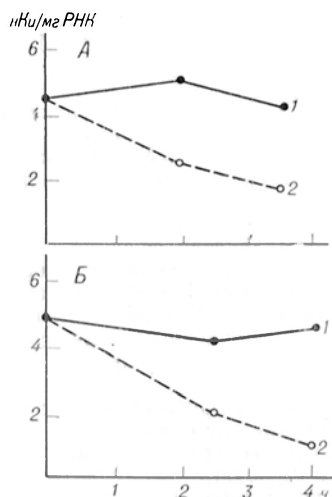


Рис. 1. Содержание радиоактивной РНК (А) и суммарной мРНК (Б), меченных в течение 20 мин, в цитоплазме клеток гепатомы Зайдела на фоне действия актиномицина D (1) и его комбинации с ЦГИ (2).

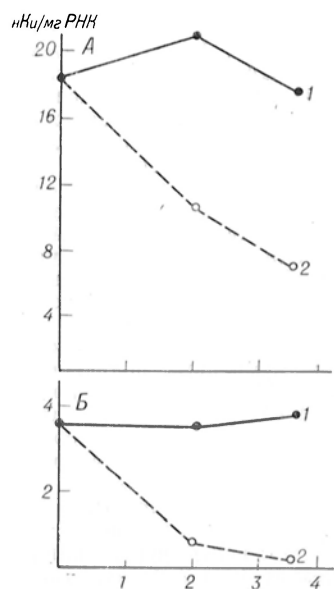


Рис. 2. Содержание радиоактивной суммарной мРНК (А) и поли-А(+)-мРНК (Б), меченных в течение 40 мин, в цитоплазме клеток гепатомы Зайдела на фоне действия актиномицина D (1) и его комбинации с ЦГИ (2).

времени и определяли радиоактивность РНК во фракции S-15, полученной из клеток гепатомы Зайдела. Как видно из рис. 1, А, радиоактивность РНК в расчете на 1 мг РНК фракции S-15 не изменяется при увеличении продолжительности действия актиномицина D от 2 до 3,5 ч. При одновременном действии актиномицина D и ЦГИ содержание предварительно меченной РНК было значительно меньше (в тех же интервалах времени), чем в случае действия одного актиномицина D.

В следующих опытах было исследовано влияние ЦГИ на содержание радиоактивной РНК, образованной на фоне подавления синтеза рРНК низкими дозами актиномицина D, т. е. суммарной мРНК. В остальном постановка опытов была такой же, как на рис. 1, А. На рис. 1, Б видно, что радиоактивность суммарной мРНК в расчете на 1 мг РНК фракции S-15 на фоне действия актиномицина D (от $2\frac{1}{2}$ до 4 ч) практически не изменяется. Однако при одновременном действии актиномицина D и ЦГИ отмечается значительное уменьшение содержания радиоактивной мРНК.

На рис. 2 представлены результаты по измерению радиоактивности суммарной мРНК и поли-А(+)-мРНК, меченных ^{14}C -уридином в течение 40 мин

в цитоплазме клеток гепатомы Зайдела в описанных выше условиях. В случае поли-А(+)-мРНК радиоактивность рассчитывали на 1 мг высокомолекулярных РНК (рРНК и мРНК), освобожденных от тРНК [1]. Видно, что радиоактивность суммарной мРНК (А) и поли-А(+)-мРНК (Б) не изменяется при увеличении времени действия актиномицина D вплоть до 3¹/₂ ч. При одновременном действии 2 антибиотиков радиоактивность суммарной мРНК и поли-А(+)-мРНК значительно уменьшается.

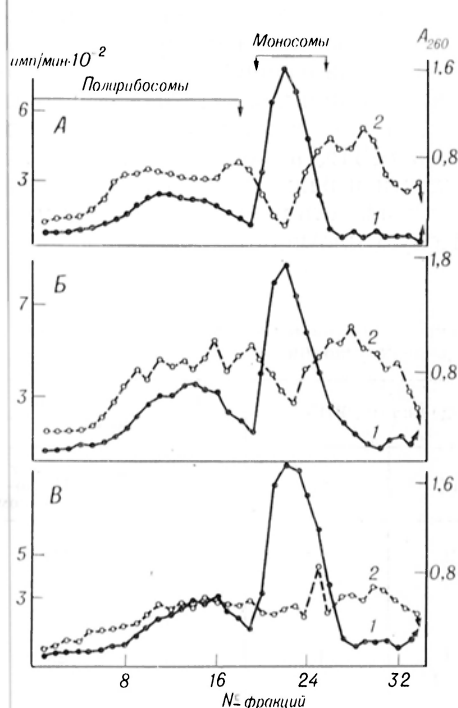


Рис. 3. Распределение радиоактивной мРНК клеток гепатомы Зайдела в градиенте концентрации сахарозы (5—30%).

А — контроль; Б — то же + актиномицин D; В — то же + актиномицин D и ЦГИ. 1 — оптическая плотность при 260 нм; 2 — радиоактивность.

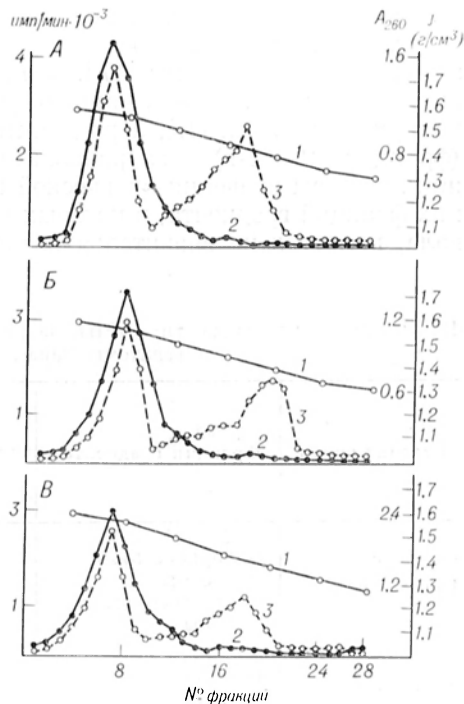


Рис. 4. Распределение радиоактивной мРНК клеток гепатомы Зайдела в градиенте плотности CsCl.

А — контроль; Б — то же + актиномицин D; В — то же + актиномицин D и ЦГИ. 1 — плотность фракций градиента (г/см³); 2 — оптическая плотность при 260 нм; 3 — радиоактивность.

Известно, что мРНК в цитоплазме клеток эукариотов обнаруживается как в составе полирибосом, так и в цитоплазматических мРНК-частицах — информосомах [16]. В связи с этим нам представлялось интересным исследовать распределение радиоактивной мРНК в обоих классах мРНК-комплексов в клетках гепатомы Зайдела при действии актиномицина D и его комбинации с ЦГИ. Для выяснения этого вопроса крысам 3 групп с асцитной гепатомой Зайдела вводили по 150 мкКи ³H-уридина на фоне подавления синтеза рРНК низкими дозами актиномицина D. Контрольных животных забивали через 40 мин после введения ³H-уридина. Подопытным крысам обеих групп через 40 мин после введения ³H-уридина вводили соответственно актиномицин D и актиномицин D с ЦГИ. Животных забивали через 2—2¹/₂ ч после введения ингибиторов. Фракции S-15, полученные из клеток гепатомы, центрифугировали в градиенте концентрации сахарозы.

На рис. 3 видно, что радиоактивность, связанная с мРНК, во всех трех случаях — в контроле, с актиномицином D и в комбинации двух антибиотиков — определяется в разных областях градиента: в полирибосомах, моносоме и пострибосомной зоне. Зоны полирибосом и моносом при данных

условиях центрифугирования были определены в опытах с использованием панкреатической РНК-азы. Распределение радиоактивности в области полирибосом совпадает с распределением оптической плотности. Радиоактивность в пострибосомной области не соответствует оптической плотности и, по-видимому, связана главным образом с мРНК цитоплазматических мРНК-частиц (информосом). Обращает на себя внимание, что радиоактивность определяется и в области моносом, хотя в этих опытах синтез рРНК блокировался низкими дозами актиномицина D. По-видимому, радиоактивность в этой зоне градиента связана с мРНК информосом, область седиментации которых перекрывается областью седиментации моносом, как это было показано на клетках миеломы [17]. В связи с этим в дальнейших расчетах радиоактивность с 1-й по 18-ю фракцию градиента мы приняли за радиоактивность полирибосомной мРНК, а радиоактивность в постполирибосомной области (фракции 19—34-я) — за радиоактивность мРНК информосом. На рис. 3 не приведены значения оптической плотности и радиоактивности 4 последних фракций градиента, в которых радиоактивность практически отсутствовала, несмотря на значительную оптическую плотность.

Т а б л и ц а 1

Изменение радиоактивности мРНК полирибосом и пострибосомных частиц в клетках гепатомы Зайдела в разных условиях

Условия опыта	Фракции градиента	Содержание РНК		Радиоактивность мРНК, имп/мин · 10 ⁻³	
		мг	%	на 1 мг РНК рибосом	на 1 мг РНК по- лирибосом
Контроль	Полирибосомы	0,19	48	13,75	29,0
	Моносомы	0,21	52	—	—
	Пострибосомные частицы	—	—	12,65	—
Актиномицин D	Полирибосомы	0,22	47	13,7	29,5
	Моносомы	0,253	53	—	—
	Пострибосомные частицы	—	—	13,4	—
Актиномицин D + ЦГИ	Полирибосомы	0,175	38	7,7	20,0
	Моносомы	0,283	62	—	—
	Пострибосомные частицы	—	—	8,58	—

Количественные данные, полученные в опытах, представлены в табл. 1, из которой видно, что содержание полирибосом и моносом в контроле составляло приблизительно по 50% (суммарное количество РНК в полирибосомах и моносомах принято за 100%). Эти данные хорошо согласуются с данными о соотношении полирибосом и моносом в других опухолевых клетках [18]. При 2¹/₂-часовом действии актиномицина D соотношение полирибосом и моносом не изменялось по сравнению с контролем. С другой стороны, при одновременном действии актиномицина D и ЦГИ отмечалось уменьшение содержания полирибосом с параллельным увеличением количества моносом. Это может свидетельствовать о том, что на фоне действия ЦГИ происходит разрушение части полирибосом в клетках гепатомы Зайдела. Было также определено относительное содержание радиоактивной мРНК в полирибосомах и пострибосомных частицах. Как видно из табл. 1, радиоактивность полирибосомной мРНК и мРНК в пострибосомных частицах (в расчете на 1 мг РНК рибосомных фракций градиента) при действии актиномицина D остается практически такой же, как в контроле. При одновременном действии актиномицина D и ЦГИ содержание радиоактивной мРНК как в полирибосомах, так и в пострибосомных частицах было меньше, чем в контроле.

Из табл. 1 также видно, что радиоактивность полирибосомной мРНК в расчете на 1 мг РНК полирибосом в контроле и при действии актиномицина D оказалась практически одинаковой. При действии обоих ингибиторов радиоактивность полирибосом была меньше, чем в контроле. Иными словами, на фоне действия ЦГИ отмечается «обеднение» полирибосом радиоактивной мРНК по сравнению с контролем (см. также рис. 3). Для объяснения этого факта можно предложить следующую возможность. В опытах, результаты которых представлены на рис. 3 и в табл. 1, радиоактивный предшественник вводился на 40 мин. Учитывая большую стабильность мРНК в опухолевых клетках [19, 20], а также данные о различной скорости мечения мРНК в опухолях [21], трудно себе представить, что за данный промежуток времени «пометятся» все молекулы мРНК полирибосом. За это время может пометиться лишь часть полирибосомной мРНК, тогда как другая фракция мРНК полирибосом будет оставаться немеченой [21]. Разрушение радиоактивной мРНК полирибосом на фоне действия комбинации актиномицина D и ЦГИ должно приводить к уменьшению удельной радиоактивности суммарной полирибосомной мРНК по сравнению с контролем, что и наблюдалось в наших опытах (см. рис. 3 и табл. 1).

Данные, представленные на рис. 3 и в табл. 1, показывают, что при совместном действии актиномицина D и ЦГИ количество предварительно меченной мРНК полирибосом и информосом в клетках гепатомы Зайдела уменьшается по сравнению с таковым при действии одного актиномицина D.

Однако необходимо отметить, что центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы не позволяет четко разделить радиоактивность, связанную с мРНК полирибосом и информосом. Дело в том, что информосомы в этих условиях могут седиментировать в широкой зоне, перекрывающейся областью легких полирибосом, как это показано для клеток печени [2] и миеломы [17]. В связи с этим проведенное нами выше разделение радиоактивности мРНК двух классов мРНК-частиц является в определенной степени условным. Именно поэтому в следующих опытах для разделения полирибосом и информосом был использован метод центрифугирования РНК-частиц в градиенте плотности CsCl.

В этих опытах крысам 3 групп с асцитной гепатомой Зайдела вводили по 120 мкКи ^{14}C -уридина на фоне подавления синтеза рРНК низкими дозами актиномицина D. Контрольных животных забивали через 1 ч после введения ^{14}C -уридина. Подопытным крысам через 1 ч после ^{14}C -уридина вводили актиномицин D или актиномицин D с ЦГИ и через 3 ч после введения ингибиторов животных забивали. РНК-частицы цитоплазмы клеток гепатомы Зайдела центрифугировали в градиенте плотности CsCl (см. «Методика»).

Как видно на рис. 4, и в контроле, и в случае актиномицина D и его комбинации с ЦГИ радиоактивная мРНК определялась в двух областях градиента. При этом радиоактивность в первом пике седиментировала в зоне плотности от 1,58—1,59 до 1,54 г/см³ с максимумом в области 1,55—1,56 г/см³. Радиоактивность в этой области градиента полностью совпадала с профилем оптической плотности при 260 нм и скорее всего была связана с полирибосомной мРНК [16]. Радиоактивность во второй области градиента седиментировала широким пиком в зоне плотности от 1,5 до 1,37—1,38 г/см³ с максимумом в области 1,39—1,4 г/см³ и не совпадала с оптической плотностью при 260 нм. Такое положение при центрифугировании в градиенте плотности CsCl характерно именно для цитоплазматических мРНК-частиц (информосом) [16]. Количественные данные, полученные в этих опытах, представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что радиоактивность мРНК полирибосом и информосом в расчете на 1 мг РНК градиента в контроле и при действии актиномицина D практически одинакова. В то же время отмечается уменьшение радиоактивности мРНК обоих классов мРНК-частиц при одновременном действии актиномицина D и ЦГИ, причем в случае информосом это уменьшение было несколько более выражено.

В клетках эукариотов содержатся мембраносвязанные и свободные полирибосомы, причем в отличие от нормальных клеток печени, у которых основная часть (около 65%) полирибосом связана с мембранами эндоплазматического ретикула [22], в опухолевых клетках, в частности в клетках асцитной гепатомы Зайдела крыс, лишь 20% полирибосом связано с мембранами, а 80% определяется в свободном состоянии в цитоплазме [7]. В связи

Таблица 2

Изменение радиоактивности мРНК полирибосом и цитоплазматических мРНК-частиц в клетках гепатомы Зайдела в разных условиях

Условия опыта	Фракции градиента	Радиоактивность мРНК, имп/мин · 10 ⁻³	
		общая	на 1 мг РНК полирибосом
Контроль	Полирибосомы мРНК-частицы	13,2	49,8
		13,7	51,2
Актиномицин D	Полирибосомы мРНК-частицы	9,9	43,6
		11,0	47,7
Актиномицин D + ЦГИ	Полирибосомы мРНК-частицы	8,58	25,2
		7,26	21,1

Таблица 3

Изменение радиоактивности мРНК полирибосом в клетках асцитной гепатомы Зайдела крыс в разных условиях

Условия опыта	Тип полирибосом	Радиоактивность мРНК полирибосом, иКи	
		общая	на 1 мг РНК полирибосом
Контроль	Суммарные	56,2	18,1
	Мембраносвязанные	8,1	12,5
	Свободные	38,2	20,1
Актиномицин D	Суммарные	59,7	17,0
	Мембраносвязанные	7,0	13,0
	Свободные	42,9	18,0
Актиномицин D + ЦГИ	Суммарные	19,6	8,0
	Мембраносвязанные	2,2	3,0
	Свободные	17,4	10,3

с этим представляло интерес исследовать влияние ЦГИ на содержание предварительно меченной мРНК обоих классов полирибосом в клетках гепатомы Зайдела.

Для этого в 3 группах крысам с асцитной гепатомой Зайдела вводили по 100 мкКи ¹⁴C-уридина на фоне подавления синтеза рРНК низкими дозами актиномицина D. Контрольных животных забивали через 40 мин, подопытным через 40 мин после ¹⁴C-уридина вводили актиномицин D или актиномицин D с ЦГИ; животных забивали через 3 1/2 ч. Из клеток асцитной гепатомы Зайдела получали суммарные, мембраносвязанные и свободные полирибосомы, в которых определяли радиоактивность и содержание РНК. Радиоактивность полирибосомной мРНК рассчитывали на 1 мг РНК полирибосом.

Из табл. 3 видно, что радиоактивность мРНК суммарных, мембраносвязанных и свободных полирибосом клеток гепатомы Зайдела при действии актиномицина D остается практически такой же, как в контроле. При одновременном действии 2 антибиотиков радиоактив-

ность мРНК всех классов полирибосом значительно уменьшается по сравнению с контролем.

Таким образом, при использовании разных методов и разной продолжительности мечения содержание радиоактивной мРНК в цитоплазме клеток асцитной гепатомы Зайдела практически не изменялось при действии актиномицина D в течение 3 1/2—4 ч. На клетках HeLa было также обнаружено, что количество предварительно меченной поли-A(+)мРНК в цитоплазме не изменяется даже при 5-часовом действии актиномицина D [23]. Эти результаты могут свидетельствовать о большой стабильности мРНК в опухолевых клетках. Данное предположение подтверждается результатами

непосредственного определения времени жизни матриц в клетках опухолей. Так, полупериод жизни мРНК в клетках HeLa составляет 2—3 дня [19], а в клетках миеломы мышей — 12—14 ч [20]. С другой стороны, при ингибировании ЦГИ белкового синтеза отмечается уменьшение содержания радиоактивной мРНК как в полирибосомах, так и в информосомах клеток гепатомы Зайдела (см. выше). Некоторые авторы предполагают, что на фоне действия актиномицина D происходит разрушение мРНК в цитоплазме клеток гепатомы, но в ядрах этих опухолевых клеток существует значительный по размерам фонд предшественников мРНК, способный поддерживать ядерно-цитоплазматический транспорт матриц на постоянном уровне даже после полного блока синтеза РНК [8]. В таком случае уменьшение содержания мРНК в клетках гепатомы Зайдела при действии ЦГИ, обнаруженное в наших опытах, можно было бы объяснить тем, что ЦГИ препятствует транспорту мРНК из ядра в цитоплазму. Против этой возможности свидетельствуют данные, показывающие, что в клетках HeLa [6] и асцитной гепатомы Зайдела [7] ЦГИ не влияет на ядерно-цитоплазматический транспорт мРНК. Более того, в клетках HeLa, в которых содержание радиоактивной мРНК в цитоплазме оставалось постоянным в течение 5 ч действия актиномицина D (см. выше), транспорт предварительно меченной мРНК из ядра отмечался лишь в течение 20—25 мин после добавления к культуре этого антибиотика [6]. Сопоставление изложенных данных позволяет думать, что мРНК в клетках гепатомы Зайдела, стабильная при действии актиномицина D в течение $3\frac{1}{2}$ —4 ч, начинает разрушаться при подавлении ЦГИ белкового синтеза. Дополнительное подкрепление сделанному предположению было получено нами при исследовании активности различных РНК-аз в клетках гепатомы Зайдела в описанных выше условиях.

В данной серии опытов крысам с асцитной гепатомой Зайдела вводили актиномицин D (5 мг на 1 кг массы) или актиномицин D с ЦГИ, животных забивали через $2\frac{1}{2}$ —3 ч. Во фракциях S-15, полученных из клеток гепатомы Зайдела, определяли активность кислых и щелочных РНК-аз. Кроме того, определяли активность эндо-РНК-аз и ПНФ-азы, связанных с полирибосомами клеток гепатомы.

Как видно из табл. 4, на фоне действия актиномицина D несколько увеличивается удельная активность как кислых, так и щелочных РНК-аз в цитоплазме клеток гепатомы Зайдела. При одновременном действии актиномицина D и ЦГИ удельная активность обоих типов РНК-аз значительно возрастает. Была также определена активность щелочных РНК-аз во фракции S-15 клеток гепатомы в присутствии п-хлормеркуриобензоата (ПХМБ) в концентрации $2,2 \cdot 10^{-4}$ М. Как известно [24], ПХМБ оказывает мощное инактивирующее действие на белковые ингибиторы РНК-аз. При этом он вызывает отделение белка-ингибитора от молекулы РНК-азы, что приводит к повышению активности последней. В наших опытах ПХМБ увеличивал удельную активность щелочных РНК-аз в контроле и при действии актиномицина D в одинаковой степени (соответственно в 4,5 и 4,6 раза). При совместном действии актиномицина D и ЦГИ удельная активность щелочных РНК-аз в присутствии ПХМБ повышалась лишь в 2,6 раза (см. табл. 4).

Так как сам ЦГИ непосредственно не влияет на активность РНК-аз

Т а б л и ц а 4

Активность щелочных и кислых РНК-аз в цитоплазме клеток асцитной гепатомы Зайдела крыс в разных условиях

Условия опыта	Удельная активность, ед. на 1 мг белка		
	кислые РНК-азы	щелочные РНК-азы	
		—ПХМБ	+ПХМБ
Контроль	1,074	1,05	4,72
Актиномицин D	2,09	1,58	7,3
Актиномицин D + ЦГИ	4,0	3,55	9,53

[25], то для объяснения этих данных можно предложить следующую возможность, хотя она, по-видимому, не является единственной. Показано, что ингибиторы РНК-аз являются лабильными белками [24]. Можно думать, что на фоне действия ЦГИ происходит разрушение предсуществующих белков-ингибиторов, в то время как синтез новых молекул белка-ингибитора становится невозможным, что и должно приводить к повышению активности РНК-аз. В табл. 4 обращает на себя внимание то, что удельная активность щелочных РНК-аз при действии ЦГИ и актиномицина D в 2 раза выше, чем в контроле (в условиях действия ПХМБ). Это можно объяснить тем, что не все комплексы РНК-аза — ингибитор чувствительны к ПХМБ, хотя синтез этих белков-ингибиторов также блокируется ЦГИ. Безусловно, для выяснения этих воз-

можностей необходимы специальные исследования.

На фоне действия актиномицина D удельная активность эндо-РНК-азы в мембраносвязанных полирибосомах клеток гепатомы Зайдела оставалась практически такой же, как в контроле. В то же время отмечалось некоторое повышение удельной активности эндо-РНК-азы в свободных полирибосомах (табл. 5). При одновременном действии актиномицина D и ЦГИ удельная активность эндо-РНК-азы значительно повышалась как в мембраносвязанных, так и в свободных полирибосомах, причем в случае мембраносвязанных полирибосом это повышение

Т а б л и ц а 5
Активность эндо-РНК-азы в мембраносвязанных и свободных полирибосомах клеток асцитной гепатомы Зайдела крыс в разных условиях

Условия опыта	Тип полирибосом	Удельная активность эндо-РНК-азы	
		ед. на 1 мг белка	%
Контроль	Мембраносвязанные	0,067	100
	Свободные	0,47	100
Актиномицин D	Мембраносвязанные	0,08	119
	Свободные	0,87	185
Актиномицин D + ЦГИ	Мембраносвязанные	0,65	970
	Свободные	1,41	300

П р и м е ч а н и е. Активность эндо-РНК-азы мембраносвязанных и свободных полирибосом в контроле принята за 100%.

было более выражено (см. табл. 5). В данном случае повышение удельной активности эндо-РНК-азы также может быть связано с нарушением синтеза белка-ингибитора на фоне подавления ЦГИ белкового синтеза. В связи с этим интересно отметить, что белковый ингибитор эндо-РНК-азы был обнаружен в рибосомной фракции надпочечников морской свинки [26]. Кроме того, в скелетных мышцах крыс обнаружены две латентные эндо-РНК-азные активности, связанные с рибосомами. При этом активность одной из этих РНК-аз повышалась при добавлении в инкубационную смесь ПХМБ, что приводило к разрушению мРНК полирибосом в условиях *in vitro*. Эти данные также свидетельствуют в пользу существования в рибосомах ингибитора эндо-РНК-азы, по-видимому, белковой природы [27].

Некоторые авторы предполагают, что в разрушении мРНК в клетках высших животных может участвовать ПНФ-аза [28]. В связи с этим представляло интерес исследовать активность этого фермента в полирибосомах клеток гепатомы Зайдела в разных условиях.

Оказалось, что удельная активность ПНФ-азы по реакции фосфорилиза поли-А в суммарных полирибосомах контрольных клеток гепатомы Зайдела, а также при 3-часовом действии актиномицина D или комбинации актиномицина D с ЦГИ составляла соответственно 1,25; 1,3 и 1,02. Таким образом, активность ПНФ-азы в клетках асцитной гепатомы Зайдела крыс при ингибировании ЦГИ белкового синтеза, когда отмечается разрушение мРНК в этих клетках (см. выше), не изменяется. В связи с этим хочется отметить,

что участие ПНФ-азы в деградации мРНК в клетках животных в условиях *in vivo* не доказано, тем более что механизм действия этого фермента не позволяет объяснить его участие в процессе разрушения матриц. Противоречие заключается в том, что разрушение РНК ПНФ-азой осуществляется с 3'-го конца молекулы, тогда как движение рибосом по мРНК в процессе трансляции происходит в направлении от 5' к 3' концу матрицы [29].

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что радиоактивная мРНК в клетках асцитной гепатомы Зайдела крыс остается стабильной при действии актиномицина D в течение $3\frac{1}{2}$ —4 ч. При одновременном действии актиномицина D и ЦГИ отмечается разрушение мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом, а также мРНК информосом. Разрушение мРНК при ингибировании ЦГИ белкового синтеза скорее всего обусловлено повышением активности РНК-аз в клетках гепатомы.

В заключение следует отметить, что в настоящей работе не исследовалось содержание быстрометящейся мРНК на ранних сроках действия актиномицина D, а также его комбинации с ЦГИ. Дальнейшие исследования этого вопроса, по-видимому, позволят изучить «поведение» быстрообменивающейся фракции мРНК в клетках асцитной гепатомы Зайдела.

Авторы приносят глубокую благодарность А. В. Лихтенштейну за участие в планировании некоторых экспериментов и обсуждении полученных результатов, а также Н. А. Александровой за помощь, оказанную при центрифугировании препаратов РНП-частиц в градиенте плотности CsCl.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арбузов В. А. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 1397.
2. Арбузов В. А. — Там же, 1978, т. 43, с. 838.
3. Арбузов В. А., Пигарева М. И. — Докл. АН СССР, 1977, т. 237, с. 721.
4. Арбузов В. А. — Биохимия, 1977, т. 42, с. 338.
5. Арбузов В. А. — Вопр. мед. химии, 1979, т. 25, с. 62.
6. Rosbach M. — J. Molec. Biol., 1972, v. 65, p. 413.
7. Арбузов В. А. — Докл. АН СССР, 1977, т. 237, с. 1505.
8. Лихтенштейн А. В. Некоторые молекулярные механизмы реализации генетической информации в нормальных, опухолевых клетках и в клетках животного-опухоленосителя. Дис. докт. М., 1977.
9. Spirin A. S., Belitsina N. V., Lerman M. J. — J. molec. Biol., 1965, v. 14, p. 611.
10. Uenoyama K., Ono T. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 281, p. 124.
11. Kirby K. S. — Biochem. J., 1956, v. 64, p. 407.
12. Сухова Т. И., Шапог В. С., Кречетова Г. Д. — Биохимия, 1978, т. 43, с. 1838.
13. Дельвиц А. А., Тарасов А. П., Дебов С. С. — Там же, 1976, т. 41, с. 2201.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
15. Munro H. N., Fleck A. — Analyst, 1966, v. 91, p. 78.
16. Spirin A. S. — Europ. J. Biochim., 1969, v. 10, p. 20.
17. MacLeod M. C. — Biochemistry (Wash.), 1975, v. 14, p. 4011.
18. Бердинских Н. К. — Биохимия, 1972, т. 37, с. 1237.
19. Murphy W., Attardi T. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, p. 115.
20. Cowan N. J., Milstein C. — J. molec. Biol., 1974, v. 82, p. 469.
21. Mauron A., Spohr G. — Europ. J. Biochem., 1978, v. 82, p. 619.
22. Арбузов В. А., Грицаева Т. Ф. — Докл. АН СССР, 1976, т. 229, с. 203.
23. Singer R. H., Penman S. — Nature, 1972, v. 240, p. 100.
24. Kraft N., Shortman K. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 217, p. 164.
25. Louis-Ferdinand R. T. — Molec. Pharmacol., 1975, v. 11, p. 185.
26. Perkins L. A., Abrass J. B., Miller H. J. et al. — J. biol. Chem., 1974, v. 249, p. 6999.
27. Шишкин С. С., Китаевцев Б. А., Дебов С. С. — Биохимия, 1978, т. 43, с. 399.
28. Дельвиц А. А. — Там же, 1978, т. 43, с. 579.
29. Арбузов В. А. — Успехи биол. химии, 1977, т. 18, с. 33.

Поступила 26/11 1979 г.

DEGRADATION OF MRNA IN MALIGNANT CELLS IN VIVO AFTER INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS BY CYCLOHEXIMIDE

V. A. Arbusov, G. D. Krechetova, M. I. Pigareva

Laboratory of Enzymology, Oncologic Research Centre Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Amount of prelabelled mRNA was unaltered in Zajhdel ascites hepatoma of rat cells within 3.5-4 hrs under conditions of treatment with actinomycin D. Due to combined effect of actinomycin D and cycloheximide the content of mRNA in the hepatoma cells was rapidly decreased. Degradation of mRNA occurred in membrane-bound polyribosomes, free polyribosomes and in cytoplasmic mRNP-particles /informosomes/ as a result of the effect of cycloheximide. Simultaneously with these phenomena, distinct increase in activity of acid and alkaline RNAases was observed in cytoplasm of the hepatoma cells; activity of endoRNAase from membrane-bound and free polyribosomes of the hepatoma was also markedly increased. Cycloheximide did not affect the activity of polynucleotide phosphorylase in polyribosomes of the hepatoma cells. Labile proteins, responsible for inhibition of RNAases appear to participate in regulation of mRNA stability in malignant cells.

УДК 612.397.3.014.46:547.473.2/.3

Ч. Б. Кайране, Э. А. Бауманис, Е. Б. Бурлакова, В. З. Горкин,
И. Э. Калниня, Е. М. Молочкина

ИЗМЕНЕНИЕ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПИДОВ ОРГАНОВ МЫШЕЙ И АКТИВНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ДИБЕНЗИЛГИДРАЗИДА D, L-ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Институт химической физики АН СССР, Институт биологической и медицинской химии,
Москва, Рижский медицинский институт

Известно, что изменение интенсивности окислительных реакций в липидах мембран влияет на активность мембраносвязанных ферментов. Перекиси липидов могут ингибировать [1, 2], активировать [3] и трансформировать [4, 5] их активность. Наряду с непосредственным влиянием перекисей липидов на активность мембранных ферментов существует и другая возможность изменения их функционального состояния. Показано, что перекисное окисление липидов вызывает изменение состава липидов и вязкости липидной компоненты мембраны, что в свою очередь приводит к изменению активности мембраносвязанных ферментов [6—8]. Направленно изменяя скорость перекисного окисления липидов разными воздействиями на организм, можно направленно влиять на активность ферментов.

Моноаминоксидаза (МАО) [амин : кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) флавиносодержащая, КФ 1.4.3.4] связана с мембранными структурами клетки (в основном с наружной митохондриальной мембраной) и осуществляет окислительное дезаминирование первичных и вторичных моноаминов. Накопление продуктов перекисного окисления липидов как *in vitro*, так и *in vivo* не только приводит к снижению активности МАО, но и инициирует ее трансформацию [4, 5]. Последний термин обозначает явление качественно обратимого изменения каталитической активности МАО, в результате которого они приобретают свойство дезаминировать азотистые соединения (гистамин, диамины, полиамины и др.), не принадлежащие к числу субстратов МАО [5].

N²-алкилгидразиды карбоновых кислот, являющиеся аналогами субстратов МАО и известные как ингибиторы активности МАО [9, 10], в определенных условиях обладают свойством вызывать трансформацию моноаминоксидазной активности [11]. В литературе описано свойство производных гидразина распадаться на свободные радикалы [12—14]. Можно было пред-

положить, что благодаря этому свойству данные вещества могут влиять на общую скорость свободнорадикального окисления липидов и в соответствии с этим трансформировать активность фермента.

Задачей нашей работы было изучить влияние ингибитора МАО — представителя N²-алкилгидразидов карбоновых кислот — на активность фермента и интенсивность окислительных процессов в условиях *in vitro* и *in vivo*. Целью работы являлось определение сходства или различия его действия в модельной системе и живом организме, изучение взаимосвязи между изменением интенсивности перекисного окисления липидов и трансформацией фермента и выявление вклада перекисного окисления липидов в модификацию активности МАО данным веществом.

Методика

В работе использовали ингибитор МАО — дибензилгидразид D, L-яблочной кислоты, дигидрохлорид, синтезированный на кафедре фармацевтической химии Рижского медицинского института. Препарат вводили внутривентрально беспородным мышам обоего пола массой 17—25 г. Контрольным животным внутривентрально вводили физиологический раствор. Мышей содержали на общевыварном рационе. В день забоя их не кормили. Животных декапитировали через определенные промежутки времени после введения препарата, извлекали печень и мозг. Липиды из органов животных экстрагировали по методу Блая и Дайера в модификации Кейтса [15].

Об интенсивности свободнорадикальных окислительных реакций в липидах судили по антиокислительной активности (АОА) липидов, которую определяли на метилолеатной окислительной модели [16]. АОА липидов характеризовали разницей периодов индукции при окислении метилолеата с добавленной липидной вытяжкой и чистого метилолеата ($\frac{\Delta\tau}{c}$), где $\Delta\tau$ — разность периодов индукции, c — концентрация липидов в метилолеате).

Для оценки влияния самого ингибитора МАО на процесс окисления метилолеата в последний вместо липидной вытяжки добавляли спиртовой раствор дибензилгидразида D, L-яблочной кислоты в концентрациях $2 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ М. В контрольный метилолеат добавляли этанол (4% по объему). Последний, как оказалось, не влияет на кинетику окисления метилолеата. Окисление проводили при $50 \pm 1^\circ\text{C}$.

Препараты митохондрий мозга мышей для определения моноаминоксидазной и собственной трансформированной МАО активности выделяли методом Шнейдера и Хогебума [17]. Активность МАО находили методом изотермической отгонки образовавшегося аммиака с последующей нesslerизацией [18, 19]. В качестве субстратов использовали серотонин, креатинин-сульфат в концентрации 10^{-3} М и гистамина гидрохлорид в концентрации 10^{-2} М.

Содержание белка в суспензии митохондрий определяли биуретовым методом [20], содержание серотонина в тканях — по Юденфренду [21, 22], гистамина — по Шору и Мецераковой [23—25].

Результаты и обсуждение

Дибензилгидразид D, L-яблочной кислоты модифицирует (трансформирует) активность МАО *in vitro* в концентрации 10^{-3} М при 5-минутной преинкубации с митохондриальной фракцией.

Основной задачей нашей работы было изучение свойства ингибитора МАО трансформировать активность фермента *in vivo*.

Ранее было установлено, что введение животным дибензилгидразида D, L-яблочной кислоты ингибирует активность МАО [25]. Наряду с ингибирующим эффектом данный препарат в определенных дозах вызывает появление гистаминдезаминной активности, что свидетельствует о трансформации МАО. На рис. 1, а представлены данные о свойствах ингибитора МАО вызывать трансформацию фермента митохондрий мозга мышей через 18 ч после введения препарата. Как следует из рисунка, трансформацию вызывает ингибитор в интервале доз 60—130 мг/кг. На рис. 1, б отражено появление при исследовании в течение суток несвойственной ферменту в норме гистаминдезаминной активности в ответ на однократное введение ингибитора МАО в дозе 100 мг/кг. Как видно из рис. 1, появление активности, свойственной трансформированной МАО, наблюдается через 6 ч после вве-

дения препарата, максимальная гистаминдезаминазная активность отмечена через 12, 15 и 18 ч. Через 21 ч наступает уменьшение гистаминдезаминазной активности. Обнаруженное в описанных выше опытах индуцирование гистаминдезаминазной активности, свойственной модифицированному ферменту, согласуется с результатами изучения изменений в содержании гистамина и серотонина в тканях мозга. Установлено, что препарат в дозе 100 мг/кг через 18 ч после введения вызывает снижение уровня гистамина в тканях мозга на 43 % и увеличение уровня серотонина на 150 % по сравнению с контролем.

Таким образом, исследованный ингибитор МАО обнаруживает свойство вызывать трансформацию фермента как *in vitro*, так и *in vivo*. Характер

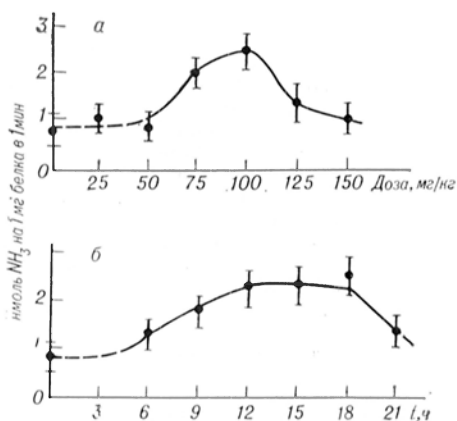


Рис. 1. Гистаминдезаминазная активность МАО митохондрий мозга мышей в зависимости от дозы N²-дбензилгидразид — D, L-яблочной кислоты (а) и времени после введения препарата в дозе 100 мг/кг (б).

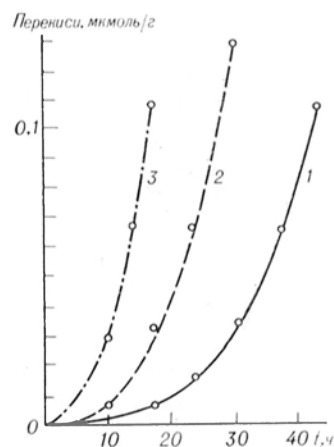


Рис. 2. Кинетические кривые накопления гидроперекисей при окислении чистого метилолеата (1) и метилолеата в присутствии ингибитора МАО в концентрациях $5 \cdot 10^{-1}$ и $2 \cdot 10^{-3}$ М (кривые 2 и 3 соответственно).

влияния ингибитора (только ингибирование или ингибирование и трансформация) зависит от введенной дозы и времени после введения. Трансформирующее влияние ингибитора МАО на фермент может быть связано с его воздействием на процессы перекисного окисления липидов.

На рис. 2 приведены кинетические кривые накопления гидроперекисей при окислении чистого метилолеата и метилолеата с растворенным в нем ингибитором МАО в двух разных концентрациях. Как видно из рис. 2, дбензилгидразид D,L-яблочной кислоты в модельной системе ускоряет перекисное окисление метилолеата, при этом ускорение процесса окисления тем сильнее, чем больше его концентрация в метилолеате. Промотирующее окисление воздействие ингибитора МАО вызвано, вероятно, свойством производных гидразина образовывать радикалы [12—14].

Исходя из этих результатов, можно было предположить, что данный ингибитор также будет усиливать процесс перекисного окисления липидов, протекающий в живом организме. Однако при введении препарата животным проявляется его двойственное действие на АОА липидов — он может как повышать, так и понижать АОА. Эффект зависит от дозы и времени после введения. На рис. 3 представлено АОА липидов мозга мышей.

Каждая точка на рис. 3—5 представляет собой среднее двух экспериментов. Графически обозначенная погрешность включает в себя как биологический разброс, так и ошибку измерений. Там, где погрешность на рисунках не обозначена, она лежит в пределах нанесенных на график кружков,

являющихся символами экспериментальных точек. Как видно из величин $\frac{\Delta\tau}{c}$, обе дозы ингибитора МАО в первые часы после введения повышают $\frac{\Delta\tau}{c}$ липидов мозга по сравнению с контролем. Препарат в дозе 120 мг/кг через 8 ч после введения вызывает существенное снижение величины $\frac{\Delta\tau}{c}$ липидов. Еще большее снижение $\frac{\Delta\tau}{c}$ наблюдается через 12 ч после инъекции. Доза 30 мг/кг не оказывает существенного влияния на АОА липидов мозга, хотя отмечается некоторое снижение $\frac{\Delta\tau}{c}$ через 8 ч и повышение через 24 ч после введения. Аналогичную с описанной выше картину изменения АОА липидов в первые часы после введения данного вещества животным можно наблюдать и в печени (см. рис. 4). Доза 30 мг/кг

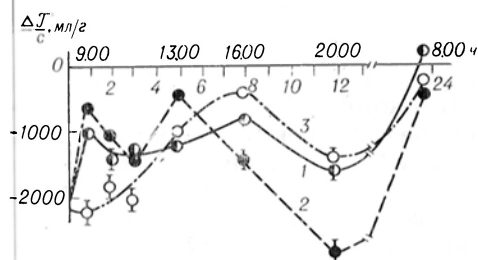


Рис. 3. Изменение АОА липидов мозга после однократного введения ингибитора МАО.

1 и 2 — доза ингибитора 30 и 120 мг/кг в течение суток; 3 — контрольные животные. По оси абсцисс: наверху — время суток, внизу — время после введения препарата (в ч).

через 1 ч после введения вызывает увеличение количества перекисей (снижение АОА липидов), но через 2 ч после введения наблюдается уменьшение их количества (повышение АОА). Это отмечается также через 3 и 8 ч после введения препарата.

В дозе 120 мг/кг изучаемый ингибитор МАО в первые часы после введения не вызывает существенных изменений в интенсивности окислительных реакций в липидах. Через 3 ч начинается значительное уменьшение АОА.

На рис. 5, а и б представлены изменения АОА липидов печени в течение 6 сут после однократного введения дибензилгидразида D,L-яблочной кислоты. Из рисунка видно, что влияние ингибитора МАО проявляется и в поздние сроки после введения. В данном случае наблюдаются также зависящие от дозы различия в действии препарата на окислительные процессы в липидах.

Следует отметить, что характер действия ингибитора МАО на интенсивность перекисного окисления липидов зависит от времени года. Это, по-видимому, связано с различным первоначальным уровнем АОА у intactных животных, который, как известно [6], изменяется от сезона к сезону. Введение ингибитора МАО в дозе 120 мг/кг при низком исходном уровне АОА у животных (1150 ед. в летний период) не вызывает понижения АОА липидов. В этих условиях не было обнаружено и трансформации ферментативной активности.

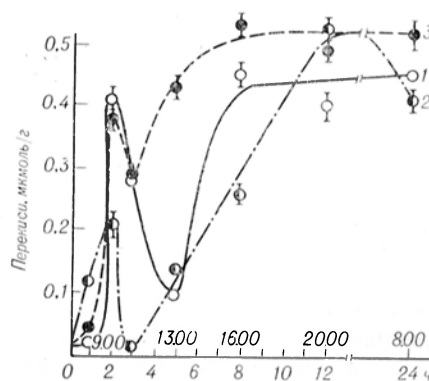


Рис. 4. Количество перекисей в окислявшемся в течение 60 ч метилолеате. 1 — контрольные животные; 2 — метилолеат окислялся в присутствии липидных вытяжек, экстрагированных из печени мышей после однократного введения 30 мг/кг ингибитора МАО; 3 — то же после однократного введения 120 мг/кг.

По оси ординат приведено количество гидроперекисей в метилолеате, окисляющемся в течение 60 ч в присутствии липидной вытяжки из печени контрольных животных и животных, которым был введен препарат, по оси абсцисс — время после введения препарата.

Таким образом, в модельной системе дибензилгидразид D,L-яблочной кислоты ускоряет перекисное окисление метилолеата, что может быть связано со свойством производных гидразина образовывать реакционноспособные радикалы. В живом организме характер влияния ингибитора MAO на окисление липидов как в мозге, так и в печени зависит от введенной дозы

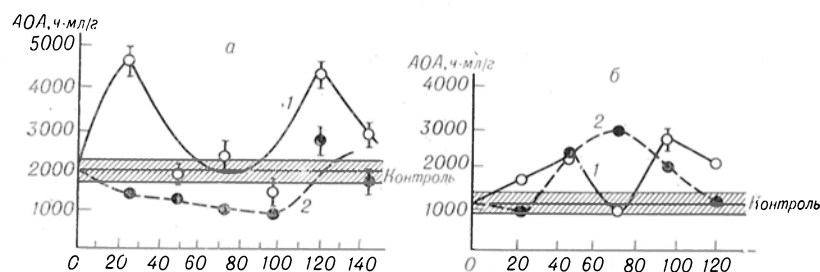


Рис. 5. Изменение АОА липидов печени мышей в течение 6 сут после однократного внутрибрюшинного введения ингибитора MAO в дозе 30 мг/кг (1) и 120 мг/кг (2). Животных забивали в 12 ч при исходном уровне АОА 2000 ед. (а) и 1150 ед. (б).

и времени после введения. Это может быть обусловлено действием продуктов превращения ингибитора MAO в организме, которые могут оказывать двойственное действие на АОА, являясь, например, ингибиторами радикальных реакций. Кроме того, влияние ингибитора MAO на АОА липидов *in vivo* может быть обеспечено вкладом в АОА повышенного уровня моноаминов, вызванного в тканях ингибированием моноаминоксидазной активности фермента.

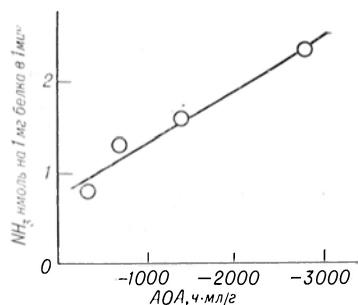


Рис. 6. Линия регрессии, характеризующая взаимосвязь между изменением АОА липидов мозга и гистаминдезаминазной активностью MAO митохондрий мозга после введения ингибитора MAO.

Коэффициент линейной регрессии $5,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,8 \cdot 10^{-4}$ (значимо отличен от 0).

Представляется интересным сопоставить данные о влиянии ингибитора MAO на активность фермента с данными о его влиянии на АОА липидов. Как уже было отмечено, препарат в дозах 25—50 мг/кг вызывает только ингибирование активности ферментов [25] и не вызывает трансформации. В интервале этих доз наблюдалось повышение АОА липидов органов при действии ингибитора MAO. Доза 120 мг/кг, вызывающая трансформацию активности фермента, усиливает процесс перекисного окисления липидов органов. Таким образом, имеется соответствие в характере влияния изучаемого вещества на АОА липидов и активность фермента.

Методом линейной регрессии установлено наличие статистически достоверной связи между АОА липидов мозга и гистаминдезаминазной активностью, свойственной трансформированному ферменту после введения препарата (рис. 6).

Приведенные данные по влиянию разных доз препарата на активность фермента и АОА липидов позволяют предположить, что трансформирующее воздействие исследуемого соединения осуществляется продуктами перекисного окисления липидов, на уровень которого влияет ингибитор MAO.

Однако следует учитывать, что интенсификация перекисного окисления липидов влечет за собой изменение состав липидов, микровязкости липидной компоненты мембраны, что в свою очередь может сказываться на функциональном состоянии мембранных ферментов, в том числе и MAO.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wills E. D.* — *Biochem. J.*, 1971, v. 123, p. 983.
2. *Bidluck W. R.*, *Tappel A. L.* — *Lipids*, 1973, v. 8, p. 177.
3. *Туровецкий В. Б.* Перекисное окисление липидов и функционирование дыхательной цепи митохондрий. Автореф. дис. канд. М., 1975.
4. *Gorkin V. Z.*, *Tatyanenko L. V.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1967, v. 27, p. 613.
5. *Горкин В. Ч.* — *Молекулярная биол.*, 1976, т. 10, с. 717.
6. Биоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. М., 1975.
7. *Бурлакова Е. Б.*, *Джамалова М. И.*, *Молочкина Е. М.* — Докл. АН СССР, 1976, т. 227, с. 991.
8. *Бурлакова Е. Б.* — В кн.: Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М., 1977, с. 16.
9. *Pletscher A.*, *Gey K. F.*, *Zeller P.* — *Fortschr. Arzneimittel-Forsch.*, 1960, Bd 2, S. 417.
10. *Бауманис Э. А.* Изыскание новых ингибиторов моноаминоксидазы среди алкилгидразидов некоторых карбоновых кислот и арилалкаламинов. Автореф. дис. канд. Рига, 1963.
11. *Baumanis E. A.*, *Kalnina I. E.*, *Moskvitina T. A.* et al. — *Biochem. Pharmacol.*, 1977, v. 26, p. 1059.
12. *Wieland H.* — *Lieb. Ann. chem.*, 1911, Bd 381, S. 200.
13. *Греков А. П.* Органическая химия гидразина. Киев, 1966.
14. *Радина Л. Б.*, *Пушкарева З. В.*, *Кокошко З. Ю.* — Докл. АН СССР, 1958, т. 123, с. 483.
15. *Кейтс М.* Техника липидологии. М., 1975.
16. *Бурлакова Е. Б.*, *Дзюба Н. М.*, *Пальмина Н. П.* — *Биофизика*, 1965, т. 10, с. 766.
17. *Schneider W. C.*, *Hogeboom G. H.* — *J. biol. Chem.*, 1950, v. 183, p. 123.
18. *Conway E. J.* — In: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. London, 1962, p. 467.
19. *Cotzias G. C.*, *Grenough J. J.* — *Nature*, 1959, v. 183, p. 4677, 1732.
20. *Cornall A. G.*, *Bardwill C. I.*, *David M. M.* — *J. biol. Chem.*, 1949, v. 177, p. 751.
21. *Udenfriend S.*, *Weisbach H.*, *Clark C.* — *Ibid.*, 1955, v. 125, p. 337.
22. *Юденфренд С.* Флюоресцентный анализ в биологии и медицине. М., 1965.
23. *Shore A. P.*, *Burkhalter A.*, *Cohn V. H.* — *J. Pharmacol. exp. Ther.* 1959, v. 127, p. 182.
24. *Мещерякова С. А.* — *Лаб. дело*, 1971, № 2, с. 103.
25. *Мещерякова С. А.*, *Герасимова М. И.* — *Лаб. дело*, 1974, № 11, с. 670.
26. *Бауманис Э. А.*, *Логина А. Ж.*, *Балткяйс Я. Я.* — *Изв. АН Латв. ССР*, 1968, № 5, с. 116.

Поступила 26/II 1979 г.

EFFECT OF DIBENZYLHYDRAZIDE OF D,L-MALIC ACID ON THE ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF LIPIDS AND ON THE MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN MOUSE TISSUES

Ch. B. Kayrane, E. A. Baumanis, E. B. Burlakova, V. Z. Gorkin, I. E. Kalnina, E. M. Molochkina

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, State Medical School, Riga

Administration of dibenzylhydrazide of D,L-malic acid (inhibitor of monoamine oxidase) into animals caused not only inhibition but also transformation of the mitochondrial monoamine oxidase activity, which acquired the property to decaminate histamine. Effect of the monoamine oxidase inhibitor on the antioxidative activity of lipids from mouse liver and brain tissues was studied. Effect of the dose administered and of the period of its action after administration were characterized. Influence of the inhibitor on oxidation of methylolate was also studied in a model system. The data obtained suggest that the transformation-producing effect of the substance was not related to its immediate action on the enzyme molecule but was apparently due to its influence on the intensity of lipid peroxidation in membranes.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.173.015.347

О. И. Писаренко, Е. Б. Минковский, И. М. Студнева, В. Г. Меримсон,
Б. В. Розынов

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ^{15}N В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Всесоюзный кардиологический научный центр и Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина, Москва

При изучении азотистого обмена с помощью изотопа ^{15}N возникает необходимость разделения и очистки азотсодержащих органических соединений, перевода их азота в аммонийную форму, последующего выделения аммиака дистилляцией (диффузией) для окисления до молекулярного азота [1—4]. Образцы азота для анализа изотопного состава не должны содержать примесей, искажающих результаты измерений (аминов, окиси углерода, окиси азота, азота воздуха и др.) [5]. В связи с этим приобретает большое значение подготовка образцов молекулярного азота для изотопного анализа. В настоящей работе описан метод определения включения ^{15}N в свободные аминокислоты и мочевину сердечной мышцы. Он может быть применен для определения изотопного состава азота этих соединений в биологических жидкостях. Преимуществами метода перед ранее описанными в литературе [3, 6] являются исключение стадий расщепления органических веществ по Кьельдалю и окисления аммиака до азота и высокая чувствительность, позволяющая снизить количество азота в пробе до 100 мкг.

М е т о д и к а

Реактивы и изотопы. В работе использовали: цитрат лития, гидрат окиси лития, ацетат натрия, пикриновую кислоту, нингидрин, соляную кислоту, бридж-35 («Merck», ФРГ); окись никеля, цеолит СаА — 100 меш (СССР); смолы: М-72 («Beckman», США), DC-3 («Pierce», США), Dowex 2×8 (100—200 меш), Dowex 50×8 — 200 меш («Serva», ФРГ), полисорб-1 (СССР); ацетат аммония- ^{15}N (95,4 ат. % N), L-аспарагиновую кислоту- ^{15}N (95,8 ат. % N), L-аланин- ^{15}N (98 ат. % N), L-глутаминовую кислоту- ^{15}N — 95,8 ат. % («VEB Berlin chemie», ГДР). Безаммиачную воду получали на деминералите «Зеролит» (Англия).

Разделение аминокислот и мочевины. Выделение свободных аминокислот и мочевины, меченных ^{15}N , из безбелкового тканевого экстракта проводили на препаративной колонке (2,5×60 см) аминокислотного анализатора «Бекман М-121» при 40°C. Колонку заполняли смолой М-72. Элюцию проводили литий-цитратным буфером pH 2,80 [8] со скоростью 260 мл/ч. Предварительно буфер пропускали через смолу DC-3 (0,9×20 см) для удаления ионов аммония. Вытекающий из колонки элюат разделяли на два потока: один со скоростью 60 мл/ч поступал в фотометр анализатора для регистрации выхода веществ, другой — со скоростью 200 мл/ч — на коллектор фракций. Расчет внутриклеточного содержания аминокислот и мочевины проводили стандартным способом; внутренним стандартом служил норлейцин. Содержание внутриклеточной воды в сердце крысы принимали равным 0,56 мл на 1 г ткани [7]. Всклеточное содержание нингидринположительных соединений принимали равным 0.

Обессоливание аминокислот и мочевины. Фракции аминокислот и мочевины очищали от компонентов буфера при помощи ионообменных смол. Аминокислоты обессоливали на колонке (0,9×10 см) с Dowex 50×8 в H^+ -форме [2]. Подкисленные до pH 2,0 фракции аминокислот наносили на колонку со скоростью 1 мл/мин. Колонку промывали 10 мл 0,02 н. HCl. Аминокислоты элюировали 0,5 н. LiOH до появления щелочи. Элюат упаривали в вакууме при 40°C. Остатки, содержащие аминокислоты и хлорид лития, высушивали досуха в эксикаторе над P_2O_5 . Фракцию мо-

мочевину последовательно пропускали через колонку 0,9×10 см с Dowex 50×8, элюируя 5 мл 0,02 н. HCl, и колонку 0,9×10 см с Dowex 2×8 в форме Cl⁻, элюируя 10 мл безаммиачной воды, со скоростью 5 мл/мин. Элюат упаривали в вакууме при 40°C и высушивали над P₂O₅.

Выделение азота аминокислот и мочевины. Для препаративного выделения азота мочевины и аминокислоты сжигали при 900°C в анализаторе CHN-2 в присутствии окиси никеля в токе гелия. Продукты окисления — азот, углекислый газ, окись углерода, воду — разделяли на хроматографической колонке анализатора, заполненной полисорбом-1, при 30°C. Азот улавливали на 50 мг цеолита СаА в ампуле при охлаждении жидким азотом. Ампулы предварительно прокалывали в токе гелия при 300°C. Количество азота в сжигаемой пробе определяли по площади пика на хроматограмме. Для определения изотопного состава веществ требовалось 100 мкг азота.

Определение изотопного состава азота. Изотопный анализ азота мочевины и аминокислот определяли при помощи масс-спектрометра МИ-1305 с двухканальной системой ввода путем сравнения с пробой азота известного состава. В качестве стандарта использовали азот с изотопным составом 0,365% ¹⁵N и 99,635% ¹⁴N [8]. При измерении изотопного состава регистрировали величину σ, определяемую по формуле: Расчет содержания ¹⁵N в исследуемых образцах проводили по формуле:

$$\sigma = \left(\frac{{}^{29}N_{\text{образца}}}{{}^{29}N_{\text{станд.}}} - 1 \right) \cdot 100(\%).$$

Расчет содержания ¹⁵N в исследуемых образцах проводили по формуле:

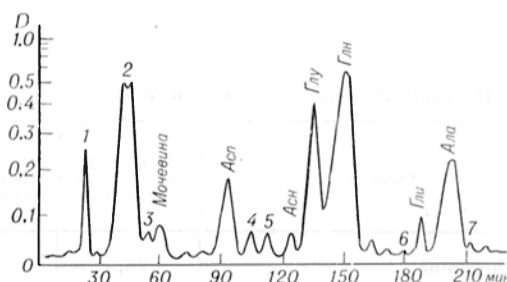
$$\text{Ат. \% } {}^{15}N_{\text{образца}} = 0,365 \left(\frac{\sigma}{100} + 1 \right).$$

Точность измерения на приборе составляла ±1,5%.

Результаты исследования

Наиболее эффективное препаративное разделение компонентов кислой фракции свободных пингидринположительных соединений ткани сердца крысы достигается на смоле М-72 («Beckman» № В 3020401 — см. рисунок). При использовании смолы «Зеролит» (25–40 мкм) и нитрий-цитратного буфера по методике [9] не происходит полного разрешения триплета аспарагина — глутаминовая кислота — глутамин, глицина и аланина. Значительное количество таурина в сердечной мышце крысы затрудняет выделение фракции мочевины. Полное разделение этих веществ наблюдали при использовании более кислого буфера (рН 2,5) и понижения температуры колонки до 25 °С. Данные о содержании некоторых свободных аминокислот сердца крысы, определенное препаративной хроматографией тканевого экстракта, приведены в табл. 1. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными ранее аналитическими методами [7, 9–11].

Для определения выхода азота после обессоливания веществ стандартную смесь мочевины и аминокислот, указанных в табл. 1, количество которых соответствовало содержанию в 5 г ткани, наносили на колонку анализатора. Фракции мочевины, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, аланина собирали и обессоливали. Количество азота в каждой фракции определяли с помощью CHN-анализатора. Данные опыта сопоставлены с расчетными величинами в табл. 2. Выход азота из фракций аспарагиновой, глутаминовой кислот, аланина, глутамина близок к теоретическому. Содержание азота мочевины ниже расчетного из-за отбора лишь части фракции этого вещества. Во всей собранной фракции количество азота достовер-



Хроматограмма кислой фракции безбелкового тканевого экстракта сердечной мышцы крысы. 1 — цистеиновая кислота; 2 — таурин; 3 — фосфоэтанолламин; 4 — треонин; 5 — серин; 6 — пролин; 7 — цитруллин.

но превышало (на 20%) расчетное за счет таурина. Выход азота глутаминовой кислоты был выше теоретического при пониженном содержании азота фракции глутамин.

Результаты определения изотопного состава азота аминокислот с известным содержанием ^{15}N приведены в табл. 3. Из нее видно, что изотопный

Т а б л и ц а 1

Содержание некоторых азотистых соединений сердца крысы после отмывки от крови 20 мл раствора Кребса — Ханзеля

Соединение	Концентрация в сердечной мышце	
	мкмоль на 100 мл экстракта	мкг на 1 г ткани
Таурин	4800 ± 400	3360 ± 336
Мочевина	250 ± 50	80 ± 16
Аспарагиновая кислота	204 ± 9	152,5 ± 7,6
Серин	40 ± 1	23,5 ± 0,6
Треонин	50 ± 2	33,3 ± 1,3
Аспарагин	56 ± 9	41,4 ± 6,8
Глутаминовая кислота	770 ± 20	633,8 ± 16,8
Глутамин	800 ± 30	654 ± 25
Пролин	40 ± 10	25,8 ± 4,1
Глицин	38 ± 1	16,0 ± 0,5
Аланин	302 ± 5	150,5 ± 3,8
Цитруллин	25 ± 5	24,5 ± 4,6

Т а б л и ц а 2

Выход азота из фракций мочевины и аминокислот после обессоливания

Количество вещества, нанесенного на колонку, мг	Содержание азота рас-четное, мг		
	Количество азота, мг	Количество азота, мг	Выход азота, %
Мочевина, 0,4	0,184	0,125	67,9
Аспарагиновая кислота, 0,76	0,070	0,110	59,7
		0,135	73,4
		0,074	105,7
Глутаминовая кислота, 3,17	0,301	0,058	82,8
		0,060	85,7
		0,320	166,3
Глутамин, 3,27	0,627	0,316	104,9
		0,328	108,9
		0,538	85,8
Аланин, 0,75	0,118	0,520	82,9
		0,522	83,2
		0,102	86,5
		0,112	94,9
		0,108	91,5

Т а б л и ц а 3

Изотопный состав азота мочевины и аминокислот со стандартным содержанием ^{15}N

Стандарт	Количество ^{15}N в стандарте, мкг	Количество ^{14}N в стандарте, мкг	Избыток ат. % в стандарте	Избыток ат. % ^{15}N в азоте
Мочевина	23,5	12,965	0,181	0,176 ± 0,006 0,184 ± 0,008 0,179 ± 0,005
Глутаминовая кислота	141,0	12,965	1,086	1,076 ± 0,006 1,081 ± 0,007 1,069 ± 0,010
Аланин	47,0	12,965	0,361	0,368 ± 0,008 0,352 ± 0,008 0,351 ± 0,006
Аспарагиновая кислота	94,0	12,965	0,719	0,710 ± 0,005 0,707 ± 0,010 0,706 ± 0,008

состав в образцах, полученных сжиганием аминокислот в CHN-анализаторе с точностью ошибки измерения ±0,005—0,01 ат. %, соответствует содержанию ^{15}N в стандартах. Это свидетельствует о том, что при разделении продуктов сгорания на колонке CHN-анализатора и запаивании ампул не происходит загрязнения азота и разбавления его воздухом.

Вся последовательность операций по разделению меченных ^{15}N соединений тканевого экстракта и их очистке, приготовлению образцов азота для изотопного анализа была выполнена на стандартной смеси (см. табл. 1), содержащей мочевину (0,546 ат. % ^{15}N), глутаминовую кислоту (1,451 ат. %

^{15}N), аланин (0,726 ат. % ^{15}N), аспарагиновую кислоту (1,084 ат. % ^{15}N). Количество веществ в смеси соответствовало их содержанию в 5 г ткани сердца. Изотопный состав азота этих соединений, а также выделенного из смеси глутамина отвечает исходному содержанию ^{15}N в этих соединениях (табл. 4). Обращает на себя внимание пониженное содержание ^{15}N в образцах глутаминовой кислоты и мочевины. Очевидно, гидролиз глутамина до глутаминовой кислоты и аммиака, происходящий при разделении компонентов смеси на колонке аминокислотного анализатора [12, 13], приводит к увеличению содержания немеченой глутаминовой кислоты. Этот вывод подтверждается данными табл. 2, указывающими на низкий выход азота фракции глутами-

Т а б л и ц а 4

Изотопный состав азота аминокислот и мочевины выделенных из стандартной смеси

Вещество	Ат. % ^{15}N исходн.	Ат. % ^{15}N азота	Изменение*
Мочевина	0,546	$0,518 \pm 0,007$	$-3,66 \pm 0,05$
		$0,502 \pm 0,003$	$-8,05 \pm 0,14$
		$0,520 \pm 0,006$	$-4,76 \pm 0,05$
Аспарагиновая кислота	1,084	$1,062 \pm 0,010$	$-2,03 \pm 0,02$
		$1,068 \pm 0,008$	$-1,47 \pm 0,01$
		$1,060 \pm 0,006$	$-2,21 \pm 0,01$
Глутаминовая кислота	1,451	$1,354 \pm 0,005$	$-6,68 \pm 0,02$
		$1,362 \pm 0,006$	$-6,05 \pm 0,02$
		$1,348 \pm 0,008$	$-7,10 \pm 0,01$
Глутамин	0,365	$0,367 \pm 0,007$	$+0,55 \pm 0,01$
		$0,370 \pm 0,005$	$+1,40 \pm 0,01$
		$0,374 \pm 0,005$	$+2,46 \pm 0,03$
Аланин	0,726	$0,716 \pm 0,005$	$-1,38 \pm 0,01$
		$0,712 \pm 0,006$	$-1,93 \pm 0,01$
		$0,710 \pm 0,010$	$-2,20 \pm 0,02$

* Процент от исходного ат. % ^{15}N .

на и, как следствие, — обеднение пробы азотом-15. Не исключено, что в случае высокого содержания ^{15}N в аминокислоте глутамин можно ожидать загрязнения азота глутаминовой кислоты ^{15}N . Азот глутамин в условиях опыта не обогащался ^{15}N .

Обеднение ^{15}N фракции мочевины может быть связано с недостаточным полным отделением ее от таурина.

Повторное использование одной и той же порции смолы М-72 для разделения соединений, меченных ^{15}N , не приводит к ее загрязнению тяжелым азотом при условии регенерации колонки 2 н. LiOH в течение 1 ч после каждого опыта.

Изложенный выше метод определения ^{15}N был использован при изучении утилизации аммиака ^{15}N аминокислотами и мочевиной сердца крысы.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bernat I., Colnidos I. — Chem. Abstr., 1971, v. 75, p. 92280b.
2. Colnidos I., Medzihradszky H., Bernat I. — Haematologia, 1970, v. 4, p. 21—30.
3. Furst P., Johnson A. — Acta chem. scand., 1971, v. 25, p. 930—942.
4. Wilson R. P., Blomfield R. A. — Analyt. Biochem., 1971, v. 43, p. 1—6.
5. Fielder R., Proksch G. — Analyt. chim. Acta, 1972, v. 60, p. 277—285.
6. Chain E. B., Chiozzotto M., Pocchiari F. et al. — Proc. roy. Soc. Lond. B., 1960, v. 152, p. 290—297.
7. Posner B., Miezowski L., Falleu E. — J. molec. Cell. Cardiol., 1973, v. 5, p. 221—233.
8. Beynon J. H. Mass Spectrometry and Its Applications to organic Chemistry. New York, 1960, p. 570.
9. Spackman D. N., Stein W. H., Moore S. — Analyt. Chem., 1958, v. 30, p. 1190—1203.

10. *Morgan H. E., Eare D. C. N., Broadus A. et al.* — J. biol. Chem., 1971, v. 246, p. 2152—2162.
11. *Scharff R., Wool I. C.* — Biochem. J., 1965, v. 97, p. 257—276.
12. *Blangshard K. C., Bradford H. F., Dodd P. K. et al.* — Analyt. Biochem., 1975, v. 67, p. 233—244.
13. *Iallan H. H., Moore S., Stein W. H.* — J. biol. Chem., 1954, v. 111, p. 927—932.

Поступила 22/1 1979 г.

A MODIFIED METHOD FOR ESTIMATION OF ¹⁵N CONCENTRATION IN BIOLOGICAL MATERIAL

O. I. Pisarenko, E. V. Minkovsky, I. M. Studneva, V. G. Merimson, B. V. Rosynov

All-Union Cardiologic Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR,
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow

A method is described for preparation of nitrogen samples and estimation of ¹⁵N concentration in free amino acids and urea, isolated from heart muscle, using mass-spectrometric analysis. Components of the tissue extracts were separated at the preparative scale; amino acids and urea were desalted by means of ion exchange chromatography. CHN-analyzer was used to measure content of nitrogen in urea and amino acids. The method required about 100 μg of nitrogen for the isotope analysis.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ПОМЕЩЕННЫХ В 1979 ГОДУ В ЖУРНАЛЕ «ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ»

- | | |
|---|--|
| <p><i>Аблаев Н. Р., Петрова Г. И., Солтыбаева Д. К.</i> Активность α-глицерофосфатдегидрогеназы в органах и тканях кроликов при различных эндокринных нарушениях. 6, 683.</p> <p><i>Агаев Т. М., Пигарева З. Д.</i> Влияние ранней зрительной депривации на активность глутаматдекарбоксилазы в зрительном анализаторе мозга. 5, 530.</p> <p><i>Алатырцев В. В., Сирота А. В., Юрков Ю. А.</i> Характеристика молекулярных разновидностей альдолазы человека и крысы с помощью электрофореза на крахмальном и агаровом гелях. 6, 723.</p> <p><i>Апуховская Л. И., Ивашикевич С. П., Вендт В. П.</i> Влияние стероидов на свойства мембран эритроцитов при экспериментальном рахите. 5, 548.</p> | <p><i>Арбузов В. А.</i> Дегградация мРНК мембраносвязанных и свободных полирибосом в клетках печени крыс на фоне действия актиномицина D и циклогексимидов. 1, 62.</p> <p><i>Арбузов В. А., Кречетова Г. Д., Пигарева М. И.</i> Разрушение мРНК в опухолевых клетках in vivo при ингибировании белкового синтеза циклогексимидом. 6, 766.</p> <p><i>Артемова Л. Г., Торховская Т. И., Щербакбаева И. А., Чернышова Н. П., Сучкова С. Н., Азизова О. А., Владимиров Ю. А.</i> Исследование структурных особенностей липопротеидов плазмы с помощью спин-меченных жирных кислот. 6, 758.</p> |
|---|--|

- Астацатурьян А. Т., Ставиский И. М., Губарева А. Е., Алимова Е. К. Биосинтез арахидоновой кислоты в тонкой кишке крыс. 3, 314.
- Банников Г. А., Чипышева Т. А. Получение моноспецифических антител к А-белку и иммунохимическое изучение его распределения в нормальных и опухолевых тканях. 3, 292.
- Барабаш Р. Д., Гукевич Е. К., Березовская З. В., Варва Г. П., Левицкий А. П., Дяченко Ю. В. Роль пероксидазы в патогенезе пародонтоза. 3, 333.
- Баращев Ю. И., Семякина А. Н. Состояние соединительной ткани при гомоцистинурии. 3, 238.
- Бём М., Гас Х., Краузе Е.-Г., Волленбергер Б., Цирцинский Г., Рабиши Г., Пфайфер К., Волленбергер А. Активность гликогенфосфоорилазы в пораженных и не пораженных инфарктом участках миокарда человека после смерти. 6, 6.
- Берштейн Л. М., Цыплина Е. В., Семглазов В. Ф., Валдина Е. А., Львович Е. Г. Взаимосвязь экскреции холестерина с мочой у онкологических больных с некоторыми гормонально-метаболическими параметрами и влияние на этот процесс некоторых лекарственных препаратов. 2, 144.
- Блох К. О., Лиходед В. С., Хипко С. Е., Нагулин Ю. А., Федорова Л. И. Синтез РНК и ядерных белков в регенерирующей и нетравмированных тканях кроликов. 5, 582.
- Богдарин Ю. А. Влияние анаболических стероидных гормонов на показатели белкового и липидного обмена при термической травме. 3, 274.
- Бос С., Костырко В. А., Березов Т. Т. Топография, некоторые физико-химические и кинетические свойства трансминаз разветвленных аминокислот слизистой оболочки желудка и поджелудочной железы. 5, 633.
- Бродская И. И., Янсен Л. И., Кудряцева Г. А. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и транскетолазы в крови нейроонкологических больных до операции и в динамике постоперационного периода. 6, 687.
- Брусова Е. Г., Кривченкова Р. С. Нарушение окислительного дезаминирования биогенных аминов в сердечной мышце при экспериментальном атеросклерозе. 2, 198.
- Брусова Е. Г., Кривченкова Р. С., Горкин В. З. Выделение, очистка и некоторые физико-химические свойства моноаминоксидазы из сердечной мышцы. 5, 626.
- Бычков С. М., Захарова М. М. Новые данные о гликозаминогликах и протеогликах. 3, 227.
- Бышевский А. Ш., Галян С. Л., Рудзевич Е. Л. Витамин К-зависимый ингибитор тромбообразования. 1, 82.
- Величко М. Г., Требухина Р. В., Островский Ю. М., Петушок В. Г., Бородинский А. Н. Влияние окситиамина на обмен пирувата и лактата в тканях крыс. 2, 166.
- Вельтищев Ю. Е., Калайджиева Л. В. Свойства лизосомальной β -галактозидазы и молекулярная генетика ганглиозидозов ГМ₁. 6, 709.
- Веремеев К. Н., Позгорелая Н. Ф. Прimenение аэросилов при активации прекалликренна плазмы крови. 4, 375.
- Владимирцев В. А., Лебедев Д. А. Современные представления об обмене и генетическом полиморфизме коллагена. 6, 659.
- Волжина-Атабегова И. Г. Активность окислительных ферментов цикла Кребса в головном мозге при гипотермии. 3, 308.
- Газдаров А. К., Газдарова И. И. Полярографическое определение гидронеркисей липидов в печени морских свинок при различной обеспеченности аскорбиновой кислотой. 5, 524.
- Галоян А. А., Абелян Ж. Г., Баев В. В., Тер-Татевосян Л. П., Парсадяян Г. К. Молекулярные механизмы регуляции гипоталамическим гексапептидом некоторых звеньев обмена гликогена. 3, 285.
- Герасимов А. М., Королева Л. А., Иванова Л. И., Панченко Л. Ф. Глутатион: дегидроаскорбат-оксидоредуктазная активность тканей крыс. 4, 447.
- Герасимова Е. Н., Торховская Т. И., Перова И. В., Базанов Е. А. Липонпротеиды плазмы крови и фракции коллагена аорты кроликов с различной степенью атеросклероза. 4, 471.
- Гобеев В. И., Березов Т. Т. Активность некоторых ключевых ферментов гликолиза и дыхания в печени крыс при химическом канцерогенезе. 4, 480.
- Головенко Н. Я., Орлюк Е. И. Влияние транквилизаторов 1,4-бенздиазепинового ряда на активность гидроксилирующего комплекса и глюкозо-6-фосфатазы гепатоцитов белых крыс. 6, 728.
- Горкин В. З., Елистратова И. А. Дезаминирование биогенных аминов при экспериментальном туберкулезе. 6, 743.
- Городецкий В. К., Исакова З. С. Кетосахара в моче больных хроническим панкреатитом. 2, 153.
- Горошинская И. А. Активность моноаминоксидаз типов А и В в условиях гипербарической оксигенации. 3, 328.
- Гуревич В. С., Денисенко А. Д., Куликова О. Г., Коношенко Н. В. Влияние таурина на связывание $^{45}\text{Ca}^{2+}$ микросомальными мембранами клеток головного мозга. 5, 565.
- Гуркало В. К., Третьяков А. В. Влияние химических гепатоканцерогенов и норадреналина на активность нуклеозидфосфокиназ клеток печени. 5, 540.
- Давыдова С. Я. Сопоставление активности и некоторых свойств 5'-нуклеотидазы в гомогенатах и плазматических мембранах нормальной печени, гепатомах и печени мышей с привитыми гепатомами различной степени злокачественности. 6, 752.
- Даскалов Д. П., Гавазова И. Г. Сравнительный электрофоретический анализ плазменных гистонподобных белков

- и некоторых других основных протенинов крыс с фибросаркомой. 5, 528.
- Деев А. И., Бикетова Д. Х., Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В. Сравнительное изучение гемолитического действия витаминов группы D. 5, 617.
- Десятниченко К. С. Об участии белково-липидных комплексов в минерализации зубной эмали. 3, 255.
- Дмитриев Л. Ф., Иванов И. И. О распределении восстановительных эквивалентов в клетке в активной фазе метаболизма бенз(а)-пирена. 4, 451.
- Дробкова И. И., Аптекарь С. Г. Содержание липидов в сыворотке крови детей и подростков. 5, 573.
- Жирнов Г. Ф., Изотов М. В., Карузина И. И., Лопухин Ю. М., Арчаков А. И. Моделирование окислительной детоксифицирующей функции печени с помощью реакций электрохимического окисления. 2, 218.
- Замараева М. В., Гасельганс А. И., Ташмухамедов Б. А. О влиянии тиреоидных гормонов на кальциевый насос саркоплазматического ретикулума. 1, 78.
- Зорькина Т. А. Ферменты тканевого дыхания печени крыс при острой кровопотере. 5, 534.
- Зубаиров Д. М., Попова Л. Г., Кринская А. В., Егорова Т. П., Федорова Н. В., Зинкевич О. Д. О механизме влияния иммобилизованного порадреналина на контактную фазу свертывания крови. 5, 544.
- Иванов В. В., Жирнов Г. Ф., Бачманова Г. И., Мазуров А. В., Арчаков А. И. Взаимодействие акрилонитрила с системой микросомального окисления печени крыс. 4, 468.
- Иванов Г. Г. Активность некоторых ферментов в энтерализованных участках слизистой оболочки желудка человека при язвенной болезни и влияние на нее желчи. 6, 691.
- Иванов В. В., Грищенко Д. А., Климацкая Л. Г. Ферменты сыворотки крови в оценке характера поражения печени и эффективности химиотерапевтических воздействий при отравлении акрилонитрилом. 6, 715.
- Инсарова И. Д., Замараева Т. В., Мазуров В. И. Коллагеназы животного происхождения. 1, 3.
- Исаева В. А., Алексеева И. А., Блажеевич Н. В., Спиричев В. Б. Экспериментальная недостаточность витамина D при различном соотношении кальция и фосфора в рационе. 1, 86.
- Кайране Ч. Б., Бауманис Э. А., Булакова Е. Б., Горкин В. З., Калнина И. Э., Молочкина Е. М. Изменение антиоксидительной активности липидов органов мышцей и активности моноаминоксидазы при действии дибензилгидразиды D, L-яблочной кислоты. 6, 776.
- Казакова О. В., Локшина Л. А., Тарханова И. О., Орехович В. И. Иммунохимические исследования катепсина D человека. 6,
- Камышева А. С., Пигарева З. Д. Энергетические процессы митохондрий эрительной системы мозга кроликов в норме и в условиях световой депривации. 5, 515.
- Карманский И. М., Пичугин А. Л., Шпиктер В. О. Действие катепсина D аорты на сывоточные липопротеиды низкой плотности. 6, 738.
- Карпицкий В. В., Гуз С. Я. Влияние преципитирующих антител к панкреатическому калликреину на контактную активацию аргинин-эстеразы крови человека и кролика. 3, 242.
- Кильдема Л. А. Чувствительность гексокиназы и глюкокиназы к гормональному воздействию при гепатоканцерогенезе. 1, 36.
- Кильдема Л. А. Изменения изоферментного состава пируваткиназы при гепатоканцерогенезе. 4, 383.
- Клименко А. И., Малышев А. Б., Шевцова М. Я. Влияние тироксина на белковый состав конденсированного и диффузного хроматина печени крыс разного возраста. 5, 568.
- Коженикова К. А. Влияние инсулина и гидрокортизона на пируваткиназу из мозгового и коркового слоя почек кроликов. 2, 171.
- Колесова Г. М., Захарова И. А., Райхман Л. М., Мошковский Ю. И. Влияние соединений платины и палладия на ферментные системы митохондрий. 5, 537.
- Конюхова Л. К., Малахов В. И. Использование α -кетобутирата для дифференциального определения активностей субъединиц изоферментов лактатдегидрогеназы. 3, 245.
- Кузнецов А. С. Комплексы апо-B содержащих липопротеидов с гликозаминогликанами с плотностью выше 1,063 г/мл в аорте человека. 3, 343.
- Куликова А. И., Романчук Л. А., Тугушева Ф. А., Чупрасов В. Б., Шостка Г. Д. Влияние гемодиализа на активность ацетилхолинэстеразы и аденозинтрифосфатазы эритроцитов при хронической почечной недостаточности. 3, 268.
- Куликов В. Ю., Ермолаева В. В., Колесникова Л. И., Молчанова Л. В., Косованова Л. В. Реакции перекисного окисления липидов в сыворотке крови больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. 3, 289.
- Кулинский В. И., Кононова Л. И., Саворенко Н. С. Исследование обмена триптамина у человека. 4, 387.
- Кунерт Э., Доведова Е. Л. Влияние световой депривации на обмен ГАМК в субклеточных фракциях зрительной системы кроликов. 4, 460.
- Левченко Л. И., Промыслов М. И. Обмен серотонина в ткани глиальных опухолей мозга. 5, 599.
- Леонтьева Т. П., Казаков А. Л., Рыженков В. Е. Влияние суммы флавоноидов из клевера красного и пуга обыкновенного на содержание липидов в крови и печени крыс. 4, 444.
- Лопухин Ю. М., Беркович М. А., Пятницкий Н. И., Арчаков А. И., Гуля-

- ев А. А., Сергиенко В. И. Экстракция холестерина из стенки сосуда поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. 1, 75.
- Лопухин Ю. М., Бородин Е. А., Сергиенко В. И., Халилов Э. М., Зюльев А. И., Люсов В. А., Арчаков А. И. Содержание холестерина в эритроцитах человека и кролика при атеросклерозе и экспериментальной гиперхолестеринемии. 4, 466.
- Ляпина Л. А., Струкова С. М., Кудряшов Б. А. Образование комплекса гепарина с протромбином. 1, 41.
- Ляпина Л. А., Кудряшов Б. А. Тромботические осложнения при блокирующем влиянии протаминсульфата на неферментативный фибринолиз в крови животных при возбуждении противосвертывающей системы. 2, 209.
- Минанкова 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. 4, 456.
- Митвеенко В. И., Камерин В. К., Гайдамак А. И., Балдин Ю. П. Мукополисахариды, коллаген и кальций костного регенерата при замещении дефекта кости методом монолокального компрессионно-дистракционного остеосинтеза. 4, 423.
- Минина Л. С. Отбор препаратов с предпологаемой антиэстрогенной активностью. 3, 283.
- Моренкова С. А., Карелин А. А. Метаболизм инсулина и взаимодействие его со специфическими рецепторами цитоплазматических мембран печени при аллоксановом диабете у крыс. 5, 604.
- Моррисон В. В. К механизму изменения энергетического и электролитного обмена в дыхательной мускулатуре при экспериментальном ботулизме. 6, 749.
- Мужиченко А. В., Никольская О. И., Хардина Г. А. Гепатотоксичность липидных компонентов липополисахаридов брюшнотифозных бактерий. 3, 319.
- Мужиченко А. В., Хардина Г. А. Влияние брюшнотифозного эндотоксина и липида А на содержание фосфолипидов в ткани печени. 4, 398.
- Михтарян В. Г., Агаджанов М. И., Казарян П. А. Влияние α -токоферола на активность некоторых ферментов биосинтеза и распада фосфолипидов при ожоговой травме. 6, 698.
- Нигуляну В. И. Некоторые биохимические изменения в непочечниках и их функция при механической травме. 3, 251.
- Никифорова А. А., Терюкова Н. П., Чистякова А. М., Климов А. И. Об участии лецитин-холестерин-ацилтрансферазы в перераспределении подфракций липопротеидов высокой плотности в крови новорожденных. 6,
- Никольская И. И., Аникийчева Н. В., Александрова С. С., Дебов С. С. Обнаружение плазмид в клетках *E. coli* СК. 4, 395.
- Нозикова Н. А. Изменения содержания порадреналина в миокарде кроликов при электростимуляции дуги аорты. 3, 272.
- Панченко Л. Ф., Ламчингийн Т., Герасимов А. М., Суханов Ю. С., Коноплина Л. А. Активность супероксиддисмутазы крови детей с железодефицитными анемиями. 2, 181.
- Панченко Л. Ф., Антоненков В. Д. Энзиматическая характеристика фракции пероксисом, выделенной с использованием гипотонической обработки субклеточных структур. 4, 402.
- Пасхина Т. С., Полянцева А. Р., Егорова Т. И., Кринская А. В., Партикова В. Ф. Компоненты кининовой системы, свободные кинины и ингибиторы протейназ в отечных жидкостях у больных с нефротическим синдромом. 5, 588.
- Перова И. В., Герасимова Е. И., Чернышева Н. И., Никитина Н. А., Щербакова И. А., Гаджалова С. И., Сучкова С. И., Зыкова В. И., Задоля А. А. Изменение апопротеинов липопротеидов очень низкой плотности плазмы крови при гипертриглицеридемии. 2, 185.
- Песчанский В. С., Либинсон Г. С. Физико-химические аспекты механизма минерализации энфизарного хряща при энхондральном остеогенезе. 3, 297.
- Пикудев А. Т., Щербань А. И. Регуляция активности Na, K-АТФ-азы мозга крыс порадреналином. 6, 719.
- Пичугин А. Л., Казакова О. В. Выделение катепсина D из аорты с помощью пенетатин-сфаразы. 6, 741.
- Платонова Т. К., Петренко О. А. Характеристика активатора плазминогена человека и фракции фибринолитической активной плазмы, обогащенной этим ферментом. 3, 302.
- Плесков В. М., Солитернова И. Б. О первой регуляции активности ферментов энергетического обмена различно функционирующих скелетных мышц кролика. 1, 55.
- Плесков В. М., Саакян И. Л., Житнухин Ю. Л. Индукция экспериментального аллергического энцефаломиелита энцефалитогенными белками миелина из спинного мозга быка. 4, 420.
- Плесков В. М., Саакян И. Л. Активность и изоферментный состав гексокиназы и лактатдегидрогеназы растворимой фракции различно функционирующих мышц кролика в норме и при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите. 4, 427.
- Плесков В. М., Саакян И. Л., Огурцов Р. П. Активность и изоферментный состав гексокиназы и лактатдегидрогеназы гладкой мышцы желудка интактных и десимпатизированных кроликов. 5, 560.
- Плетень А. П., Учитель И. А., Мазо В. К., Никуличева С. И., Волкова Л. И., Шатерников В. А. Выделение ренина из почек человека. 4, 441.
- Подгородниченко В. К., Цыпляковская Л. М., Саенко А. С., Брыксина Л. Е., Поверенный А. М. Факторы, влияющие на ДНК-связывающую активность сы-

- воротки крови больных и здоровых людей в условиях низкой ионной силы. 3, 278.
- Покровский Б. В. Получение кристаллической L-треонин (сери)-дегидратазы из печени крыс. 2, 128.
- Попов А. В., Кузнецов А. С. Изучение превращения липопротеидов в сосудистой стенке методом ультрацентрифугирования экстракта аорты в ступенчатом градиенте плотности. 2, 176.
- Правдина Н. Ф., Шобухов В. М., Веселовская Т. В., Смирнова Н. Р., Галегов Г. А. Влияние метотрексата на активность ДНК-зависимых РНК-полимераз (А и В) в селезенках мышей, зараженных вирусом лейкоза Раушера, и на развитие вирусиндуцированного лейкоза. 2, 193.
- Пузач С. С., Островский Ю. М. Антивитаминная активность тиаминазы из *V. thiaminolyticus* при различных способах введения фермента в организм животного. 2, 137.
- Пушкарев И. А., Гусева Л. Н., Борисов Л. Л. Идентификация моноклональных иммуноглобулинов методом иммунофиксированного электрофореза на ацетатцеллюлозных пленках и в агарозном геле. 2, 158.
- Пчелкина З. М., Матвеев Б. П., Рыкунов Е. И., Терентьев А. А., Татарinov Ю. С. Иммунохимическое изучение α -глобулинов в опухолевой ткани почки человека. 4, 439.
- Рабинович П. Д., Милушкин П. В. Содержание некоторых метаболитов биологического окисления в крови и моче больных язвенной болезнью. 6, 755.
- Раков С. С., Федосеева В. Н., Вотрин И. И. Исследование непатогенных нейссерий на содержание гистидинкарбоксилазы. 4, 491.
- Рачев Р. Р., Дмитров М. И. Действие тиреоидных гормонов на синтез белка в микросомах *in vitro*. 1, 20.
- Рачев Р. Р., Димитров М. И., Филипова Е. Х. Влияние триодтиронина и ICI на синтез белка в бесклеточных системах. 1, 26.
- Рожанец В. В., Промыслов М. Ш., Габриэлян Н. И., Щербанева О. И. Ингибирующее влияние ликвора на активность натрий-, калий-АТФ-азы синаптических мембран головного мозга животных. 1, 71.
- Розе Л. В., Попова И. А. Влияние норадреналина и серотонина на обмен гликогена в тканях крысы. 1, 50.
- Розе Л. В., Розенфельд Е. Л., Попова И. А., Вихерт А. М., Бекловская К. Н. Особенности регуляции обмена гликогена у крыс с экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатией. 4, 484.
- Розенфельд Е. Л. О нарушении транспорта глюкозо-6-фосфата как возможной причине гликогеноза типа 1б. 4, 371.
- Сафразбекян Р. Р., Сукасян В. С., Арзунянц Э. М. Значение исходной активности моноаминоксидазы для развития активирующего или ингибирующего действия индолилгидразидов. 3, 311.
- Севостьянов А. Н. Влияние дефицита и избытка тиамина на липидный состав плазматических мембран печени крыс. 5, 520.
- Семенов Е. В., Крылов С. С. Участие ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} и соответствующих АТФ-аз в механизме пресинаптического действия амизила и ареколина. 6, 704.
- Силаева С. А., Данилова Н. И. Изоферменты митохондриальной тимидинкиназы из нормальной и пролиферирующих тканей печени крыс. 4, 415.
- Скляднева В. Б., Чекановская Л. А., Тихоненко Т. И. Об идентификации аминокислот, участвующих во взаимодействии с ДНК в составе вирусного нуклеопротеида. 4, 436.
- Соколова В. Е., Любарцева Л. А. Влияние флавоноидов на некоторые стороны азотистого обмена при экспериментальной уремии. 4, 379.
- Солитернова И. Б., Никульчева Н. Г. Активность постгепариновой липопротеидлипазы плазмы крови кроликов. 2, 204.
- Сорокин А. С., Якобсон Г. С. Изменение активности ферментов углеводного обмена печени после однократной интоксикации крыс четыреххлористым углеродом. 4, 433.
- Стан Е. Я., Черников М. П. К вопросу о физиологической активности каппаказеинового гликомакропептида. 3, 348.
- Струмило С. А., Мацюк С. К., Виноградов В. В. Особенности обмена тиамилдифосфата в печени при острой гипобарической гипоксии. 6, 734.
- Суринов Б. П., Карпова Н. А., Румянцев И. А. Множественные формы эстераз эфиров карбоновых кислот при инфаркте миокарда. 5, 579.
- Сяткин С. П., Березов Т. Т. Окислительное дезаминирование полиаминов в гепатомах с различной скоростью роста. 5, 611.
- Сяткин С. П., Березов Т. Т. Активность орнитиндскарбоксилазы в злокачественных опухолях. 6,
- Таран Т. Т., Гулый М. Ф., Бруско А. Т., Фанак Н. М., Дворникова П. Д. Влияние карбостимулина и смеси его с витамином D_3 на процесс минерализации костной мозоли кроликов. 5, 554.
- Тец В. В. Изучение пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в состав ДНК и РНК, с помощью газожидкостной хроматографии. 5, 585.
- Токаева Л. К., Царева Т. Д. Сезонные колебания показателей калликреин-кининовой системы. 3, 266.
- Трещенкова Ю. А. Изменение активности альдолазы в некоторых органах мышей в процессе развития гепатомы 22а. 5, 607.
- Троицкий Г. В., Селиванова К. Ф., Глушкова О. В., Корниченко Н. В., Завьялов В. П. Изучение субфракционного состава и структурных характеристик иммуноглобулинов G при некоторых патологических состояниях. 2, 122.
- Труфанов А. В. Противоопухолевое действие ретинола и его производных (ретиноидов). 2, 115.

- Турова Н. Ф., Барышников В. А. Изменение концентрации свободных аминокислот развивающегося мозга под влиянием антенатальной гипоксии. 5, 622.
- Усатенко М. С., Берлин Г. И. Активность и изоферментный состав лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в сыворотке крови и эритроцитах новорожденных детей с гемолитической болезнью. 1, 59.
- Фалалеева Л. М., Васильев М. Ю., Калашников В. В., Татаринов Ю. С. Изучение биосинтеза α -фетопротина в культуре тканей эмбриона человека. 6, 731.
- Филиппова В. И., Филановская Л. И., Блинов М. И., Ушакова Е. А. Координация основного и реутилизационного путей биосинтеза нуклеотидов в лимфоцитах при лейкозе. 6, 694.
- Фоленко П. И., Ребров Л. Б. Изучение посмертного ингибирования синтеза РНК в печени и скелетных мышцах крыс. 4, 408.
- Холмина Г. В., Горкин В. З. Об окислении жирно-ароматических альдегидов в тканях печени. 3, 322.
- Цагикян Т. А., Нестерова А. П., Фролова И. А. Состояние внешнесекреторной функции поджелудочной железы у больных хроническим энтероколитом. 2, 161.
- Цветкова И. В., Золотухина Т. В., Розенфельд Е. Л., Розовский И. С. Активность гликозидаз в культуре клеток амниотической жидкости. 2, 214.
- Черников М. П., Николаевская В. Р., Стан-Е. Я. Активность трипсина и химотрипсина в период раннего постнатального развития крыс. 1, 67.
- Чибисов И. В., Розенфельд Е. Л., Чистова Л. В., Леонтьев А. Ф. Гликогеновая болезнь, вызванная дефектами фосфорилазной системы печени. 1, 47.
- Чумаков В. Н., Осинская Л. Ф. Активность цинк-, медьсодержащей супероксиддисмутазы в тканях крыс в норме и при гипоксии. 3, 261.
- Шапошников А. М., Хальчицкий С. Е., Шварц Е. И. Нарушение обмена фенилаланина и тирозина при болезни Дауна. 1, 15.
- Шафран М. Г. Выделение и некоторые свойства миелопероксидазы костного мозга человека. 2, 149.
- Шелепов В. П., Давыдова С. И., Шапот В. С. Некоторые эндокринные нарушения, вызываемые опухолью в организме. 6,
- Шестаков В. А., Бойчевская Н. О., Шерстнев М. П. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода. 2, 132.
- Якут С. И., Данилова С. А., Кульчицкий О. К. Исследование активности фосфодиэстеразы цАМФ в лейкоцитах больных бронхиальной астмой. 4, 392.
- ровых клеток без применения коллагеназы. 3, 354.
- Гончаров Н. П., Чекан С., Антоничев А. В., Качия Г. В., Бутнев Ю. В., Дисфалужи Е. Радиоиммунологический метод определения 11 стероидов в малом объеме плазмы крови обезьян. 1, 92.
- Киреев М. М., Конвай В. Д. Полумикрометод определения кислотоэкстрагируемых нуклеотидов в органах мелких лабораторных животных. 3, 352.
- Лихачева Н. В., Буробин В. А., Баращнев Ю. И., Николаева Е. А. Диагностика гистидинемии с помощью определения уроганиновой кислоты в поте энзиматическим методом. 4, 500.
- Мхеидзе М. О., Пекарская Н. А., Шапошников А. М. Экспресс-метод выявления мутантных форм холинэстеразы сыворотки крови человека. 3, 359.
- Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. Унифицированный метод определения активности α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека. 4, 494.
- Оборотова Т. А., Берман А. Е., Мазуров В. И. Сравнительная характеристика двух методов выделения фракции полирибосом, обогащенной коллагеновыми мРНК. 4, 503.
- Писаренко О. И., Минковский Е. Б., Студнева И. М., Меримсон В. Г., Розынов Б. В. Модификация метода определения ^{15}N в биологическом материале. 6, 782.
- Помойнецкий В. Д., Некрасова А. А., Косых В. А., Газарян Г. А. Новые аспекты в развитии и стандартизации метода определения простагландинов в биологических жидкостях и тканях. 5, 636.
- Филиппова Л. Б., Розанов А. Я. Микрометод получения и очистки меченого 4-метил-5 β -оксиэтилтиазола. 1, 102.
- Царюк Л. А., Рыбачук В. И., Шевченко Л. И., Толстых В. М. Определение концентрации фибриногена плазмы крови методом сульфитного осаждения. 1, 97.

Рецензии

- Владимиров Ю. А., Глебов Р. Н. Рецензия на книгу Болдырева А. А. «Биохимические аспекты электромеханического сопряжения». 3, 363.
- Касавина Б. С., Торбенко В. П. Рецензия на книгу «Краткий курс молекулярной фармакологии» под общей редакцией П. В. Сергеева. 3, 364.
- Стойда Л. В., Болдырев А. А. Рецензия на книгу Верболович В. П. «Инфракрасная спектроскопия биологических мембран». 4, 508.
- Методы биохимических исследований
- Бездробный Ю. В., Евдокимова Н. Ю. Выделение плазматических мембран жи-

Кулинский В. И., Карелин А. А. II Всесоюзный симпозиум по циклическим нуклеотидам. 5, 642.

Соловьева Н. И., Цветкова И. В. Симпозиумы по тканевым протеолитическим ферментам в норме и патологии и по

биохимическим основам наследственных заболеваний, связанных с нарушением обмена углеводов. 1, 107.

Некролог

Памяти Н. П. Мешковой. 5, 646.

СОДЕРЖАНИЕ

- Владимирцев В. А., Лебедев Д. А. Современные представления об обмене и генетическом полиморфизме коллагена (обзор) 659
- Жихарева А. И. Влияние охлаждения на фосфолипиды печени 673
- Жукова Т. П., Сорокина Е. Г., Попандопуло Ю. Г. Постгипоксические изменения обмена развивающегося мозга 676
- Аблаев Н. Р., Петрова Г. И., Солтыбаева Д. К. Активность α -глицерофосфатдегидрогеназы в органах и тканях кроликов при различных эндокринных нарушениях 683
- Бродская Н. И., Янсен Л. И., Кудрявцева Г. В. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и транскетолазы в крови нейроонкологических больных до операции и в динамике постоперационного периода 687
- Иванов Г. Г. Активность некоторых ферментов в энтенолизированных участках слизистой оболочки желудка человека при язвенной болезни и влияние на нее желчи 691
- Филиппова В. Н., Филипповская Л. И., Блинов М. Н., Ушакова Е. А. Координация основного и реутилизационного путей биосинтеза нуклеотидов в лимфоцитах при лейкозе 694
- Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Казарян П. А. Влияние α -токоферола на активность некоторых ферментов биосинтеза и распада фосфолипидов при ожоговой травме 698
- Семенов Е. В., Крылов С. С. Участие ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} и соответствующих АТФ-аз в механизме пресинаптического действия амизила и ареколлина 704
- Вельтищев Ю. Е., Калайджиева Л. В. Свойства лизосомальной β -галактозидазы и молекулярная генетика ганглиозидов GM_1 709
- Иванов В. В., Грищенко Д. А., Климацкая

CONTENT S

- Wladimirtsev, W. A., Lebedev, D. A.: Modern concepts on metabolism and genetic polymorphism of collagen 659
- Zhikhareva, A. I.: Effect of cooling on liver phospholipids 673
- Zhukova, T. P., Sorokina, E. G., Popandopulo, Yu. G.: Posthypoxic alterations in metabolism of developing brain 676
- Ablaev, N. R., Petrova, G. I., Soltybaeva, D. K.: Activity of α -glycerophosphate dehydrogenase from rabbit tissues in various endocrine disfunctions 683
- Brodskaya, N. I., Yansken, L. I., Kudryavtseva, G. V.: Activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and transketolase in blood of neurooncological patients before surgical treatment and in dynamics of postoperational period 687
- Ivanov, G. G.: Activity of some enzymes in enterolysed feci of human gastric mucosa in ulcerous disease and effect of bile on the enzymatic activity 691
- Filippova, V. N., Filanovskaya, L. I., Blinov, M. N., Ushakova, E. A.: Coordination between the main and reutilizational pathways of nucleotide biosynthesis in lymphocytes under leukosis 694
- Mkhitarian, V. G., Agadjanov, M. I., Kazarian, P. A.: Effect of α -tocopherol on the activity of certain enzymes of phospholipid biosynthesis and its impairment in burns 698
- Semenov, E. V., Krylov, S. S.: Participation of Mg^{2+} and Ca^{2+} and of corresponding ATPases in presynaptic effect of amisyle and arecoline 704
- Vel'tischev, Yu. E., Kalayjieva, L. V.: Properties of lysosomal β -galactosidase and molecular genetics of gangliosides GM_1 709
- Ivanov, V. V., Grischenko, D. A., Klimatska-

- Л. Г. Ферменты сыворотки крови в оценке характера поражения печени и эффективности химиотерапевтических воздействий при отравлении акрилонитрилом
- 715 П и ку л е в А. Т., Щ е р б а н ь А. И. Регуляция активности Na, K-АТФ-азы мозга крыс норadreналином
- 719 А л а т ы р т с е в В. В., С и р о т а А. В., Ю р к о в Ю. А. Характеристика молекулярных разновидностей альдолазы человека и крысы с помощью электрофореза на крахмальном и агаровом гелях
- 723 Г о л о в е н к о Н. Я., О р л ю к Е. И. Влияние транквилизаторов 1,4-бенздиазеинового ряда на активность гидроксилирующего комплекса и глюкозо-6-фосфатазы гепатоцитов белых крыс
- 728 Ф а л а л е с е в Д. М., В а с и л ь е в М. Ю., К а л а ш н и к о в В. В., Т а т а р и н о в Ю. С. Изучение биосинтеза α -фетопро-теина в культуре тканей эмбрио-на человека
- 731 С т р у м и л о С. А., М а ц ю к С. К., В и н о г р а д о в В. В. Особенности обмена тиаминди-фосфата в печени при острой ги-побарической гипоксии
- 734 К а р м а н с к и й И. М., П и ч у г и н А. Л., Ш п и к и т е р В. О. Действие катепси-на D аорты на сывороточные ли-попротеиды низкой плотности
- 738 П и ч у г и н А. Л., К а з а к о - в а О. В. Выделение катепсина D из аорты с помощью пенстатин-сефарозы
- 741 Г о р к и н В. З., Е л и с т р а - т о в а Н. А. Дезаминирование биогенных аминов при экспери-ментальном туберкулезе
- 743 М о р р и с о н В. В. К механизму изменения энергетического и элект-ролитного обмена в дыхатель-ной мускулатуре при экспери-ментальном ботулизме
- 749 Д а в ы д о в а С. Я. Сопоставление активности и некоторых свойств 5'-нуклеотидазы в гомогенатах и плазматических мембранах нор-мальной печени, гепатомах и пе-чени мышей с привитыми гепато-мами различной степени злока-чественности
- 752 Р а б и н о в и ч П. Д., М и л ю ш - к и н П. В. Содержание неко-торых метаболитов биологическо-го окисления в крови и моче боль-ных язвенной болезнью
- 755 А р т е м о в а Л. Г., Т о р - х о в с к а я Т. И., Щ е р б а - к о в а И. А., Ч е р н ы ш о - в а Н. П., С у ч к о в а С. Н., А з и з о в а О. А., В л а д и - м и р о в Ю. А. Исследование структурных особенностей липо-
у а, Л. Г.: The enzymes of blood serum in impairment of liver tissue by acrylonitrile and efficiency of chemotherapeutic treatment
- P i k u l e v, A. T., S c h e r b a n, A. I.: Regulation of Na K-ATPase acti- vity by noradrenalin, in rat brain
- A l a t y r t s e v, V. V., S i r o - t a, A. V., Y u r k o v, Y u. A.: Characteristics of molecular modi- fications of human and rat aldola- ses by means of starch and agar gel electrophoresis
- G o o v e n k o, N. Ya., O r l y - u k, E. I.: Effect of tranquilizers from 1,4-benzdiazipine series on the activity of hydroxylating complex and of glucose-6-phosphatase in rat hepatocytes
- F a l a l e y e v a, D. M., V a s i l ' - e v, M. Yu., K a l a s h n i - k o v, V. V., T a t a r i n o v, Y u. S.: Biosynthesis of α -fetoprotein in tis- sue culture of human embryo
- S t r u m i l o, S. A., M a t s y - u k, S. K., V i n o g r a d o v, V. V.: Peculiarities of thiamin diphosphate turnover in liver tissue under conditions of hypobaric hypoxia
- K a r m a n s k y, I. M., P i c h u - g i n, A. L., S h p i k i t e r, V. O.: Action of aortic cathepsin D on se- rum low density lipoproteins
- P i c h u g i n, I. L., K a s a k o - v a, O. V.: Purification of cathep- sin D from pig aorta using pepsta- tin-Sepharose
- G o r k i n, V. Z., Y e l i s t r a t o - v a, N. A.: Deamination of bioge- nic amines in experimental tubercu- losis
- M o r r i s o n, V. V.: On the mechanism of alterations in energy and electro- lyte metabolism of respiratory mus- cles in experimental botulism
- D a v y d o v a, S. Ya.: Comparison of activity and some properties of 5'-nucleotidase from homogenates and plasmatic membranes of normal liver tissue, from hepatomas and liver tissue of mice with hepatomas of various malignancy
- R a b i n o v i c h, P. D., M i l y - u s h k i n, P. V.: Content of some metabolites of biological oxidation in blood and urine of patients with ulcer
- A r t e m o v a, L. G., T o r k h o v - s k a y a, T. I., S c h e r b a k o - v a, I. A., C h e r n y s h o v a, N. P., S u c h k o v a, S. N., A z i z o - v a, O. A., V l a d i m i - r o v, Y u. A.: Study of structure characteristics of blood plasma li-

- протеинов плазмы с помощью спин-меченных жирных кислот
- А р б у з о в В. А., К р е ч е т о -
ва Г. Д., П и г а р е в а М. И.
Разрушение мРНК в опухолевых
клетках in vivo при ингибиро-
вании белкового синтеза циклогек-
симидом
- К а й р а н е Ч. Б., Бау ма -
нис Э. А., Б у р л а к о в а
Е. Б., Г о р к и н В. З., К а л -
н и н я И. Э., М о л о ч к и -
н а Е. М. Изменение антиокси-
сительной активности липидов
органов мышей и активности мо-
ноаминоксидазы при действии ди-
бензилгидразида D, L-яблочной
кислоты
- 758
- 766
- 776
- poproteins using spin-labelled fat-
ty acids
- A r b u s o v, V. A., K r e c h e -
t o v a, G. D., P i g a r e v a, M. I.:
Degradation of mRNA in malignant
cells in vivo after inhibition of
protein cyntthesis by cycloheximide
- K a y r a n e, Ch. B., B a u m a -
n i s, E. A., B u r l a k o -
v a, E. B., G o r k i n V. Z.,
K a l n i n y a, I. E., M o l o -
c h k i n a, E. M.: Effect of diben-
zylhydrazide of D, L-malic acid on
the antioxidative activity of lipids
and on the monoamine oxidase acti-
vity in mouse tissues

Методы биохимических исследований

- П и с а р е н к о О. И., М и н -
ковский Е. В., С т у д н е -
ва И. М., М е р и м с о н В. Г.,
Р о з ы н о в Б. В. Модифика-
ция метода определения ^{15}N в
биологическом материале
- Указатель статей, помещенных в 1979
году в журнале «Вопросы меди-
цинской химии»
- 782
- 786

Methods of Biochemical Investigations

- P i s a r e n k o, O. I., M i n k o v -
s k y, E. V., S t u d n e v a, I. M.,
M e r i m s o n, V. G., R o s y -
n o v, B. V.: A modified method
for estimation of ^{15}N concentra-
tion in biological material
- Index of papers published in the Jour-
nal «Problems of Medical Chemistry»
in 1979

Техн. редактор И. К. Арибжанова

Корректор Н. П. Фокина

Сдано в набор 03.09.79. Подписано в печать 16.10.79. 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. 13,87 Тираж 2009 Цена 80 коп. Заказ 2176

Издательство «Медицина». Москва 101838, Петроверигский пер., 6/8.
Чеховский полиграфический комбинат Союзполиграфпрома
Государственного комитета СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области